

SILVIA ROMÃO

**ASPECTOS BIOQUÍMICOS RELACIONADOS A AÇÃO ANTITUMORAL,
TOXICIDADE E METABOLIZAÇÃO DO COMPOSTO MESOIÔNICO MI-D**

Tese entregue ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção de Título de Doutor

Orientadora: Glaucia Regina Martinez

Co-orientadoras: Silvia Maria Suter Correia
Cadena

CURITIBA

2008

Ao MEU AMOR

ADAUTO

AOS MEUS FILHOS

JULIA E MARTIN

AGRADECIMENTOS

Foram quatro anos de trabalho dentro do Departamento de Bioquímica. Convivi com muitas pessoas, muitos chegaram e partiram durante este tempo, mas algumas pessoas marcaram este período com exemplos de amizade, companheirismo, dedicação, persistência, profissionalismo. A todas tenho muito a agradecer:

À Prof.^a Dr.^a Maria Benigna Martinelli de Oliveira, minha orientadora. Autoridade, liderança, seriedade, eficiência, mas também estímulo, descontração, tranquilidade, foram os grandes atributos que me levaram a admirá-la. Foram apenas dois anos de convivência, mas que nortearam todos os aspectos deste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Gláucia Regina Martinez, minha orientadora. Infelicidade minha, mas também, felicidade minha, ter duas orientadoras. Pela orientação e também pela amizade. Pelo conhecimento compartilhado e pelas noites de trabalho a mim dedicadas. À você, muito obrigada.

À Professora Silvia Maria Suter Correia Cadena, minha co-orientadora. Obrigada pela sua tranquilidade e pelo cuidado com os detalhes, que muitas vezes evitou que eu deixasse de enxergar questões importantes.

Às Prof.^{as} : Dr.^a Eva Gunilla Skare Carnieri, Dr.^a Maria Eliane Merlin Rocha, Dr.^a Guilhermina Rodrigues Noleto, sempre presentes e prontas a auxiliar.

À Stelia Carolina Méndez-Sánchez, a mais brasileira das colombianas. Por toda sua amizade. Pelo acompanhamento do trabalho e incansáveis discussões sobre o MI-D. Sempre pronta a ouvir e a compartilhar o entusiasmo pelo trabalho.

Às amigas Tatiana e Rosilene: Pela amizade, pelos grandes momentos de discussões e debates, muitas vezes calorosos. Aos colegas Paulo, Lívia, Ana Paula pelo auxílio no laboratório e à Juliana C. Amorim, pela ajuda em experimentos.

Ao Grupo de Pesquisa de Carboidratos da UFPR, pela utilização do equipamento para parte das análises de cromatografia.

Ao Grupo de Pesquisa de Fixação de Nitrogênio (UFPR), pela utilização de equipamentos para realização de westernblotting.

À Prof.^a Dr.^a Lucélia Donatti do Departamento de Biologia Celular da UFPR, pela amizade e pelo auxílio nos procedimentos de análises histológicas.

Ao Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio e à Prof.^a Lia Rieck, pelo auxílio nos experimentos de DL₅₀.

Prof. Dr. Paolo Di Mascio (IQ-USP) pela utilização do equipamento para as análises de espectrometria de massas.

À Sanepar, pelo apoio através de liberação de horário de trabalho.

Às grandes companheiras: Paula, Ana Tereza, Julia, Cynthia e Glaucia, por todo apoio, carinho e amizade.

À coordenação de Pós Graduação em Bioquímica, representada neste período pelos professores: Dr.^a Fany Reicher, Dr.^a Leda Satie Chubatsu, Dr. Miguel Daniel Nosedá, por todo apoio e auxílio prestado.

À secretária da Pós Graduação, Marilza Doroti Lamour, sempre pronta a ajudar.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica pelo auxílio prestado.

À Fundação Araucária ao CNPq e a CAPES, pelo suporte financeiro.

RESUMO

Ações biológicas do composto mesoiônico cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinaoíl]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamida (MI-D) têm sido investigadas. O composto apresenta ação antitumoral em Sarcoma-180, tumor de Ehrlich e melanoma humano e murino; ação analgésica, antipirética e anti-inflamatória *in vivo*, em ratos e camundogos, com diminuição dos níveis de PGE_2 . O presente estudo investigou aspectos da atividade antitumoral relacionada à inibição da ciclooxigenase, avaliação toxicológica e metabolização deste composto. O estudo do efeito do MI-D sobre a produção de PGE_2 em linhagens de melanoma murino (B16-F10) e humanos (SK-MEL, MEWO e MEL-85) foi realizado com a dose de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ por 2 h devido a ausência de efeito sobre a viabilidade destas células, quando avaliada pelos métodos de Azul de Tripán e Cristal Violeta. Todas as linhagens apresentaram produção de PGE_2 após indução com ácido araquidônico e quantificação por imunoensaio (ELISA). O MI-D ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) reduziu a produção de PGE_2 em 39% para SK-MEL e 57% para MEWO, mas não causou efeito em MEL-85. Nesta mesma condição, em B16-F10, houve aumento na produção de PGE_2 em 153%. Foi detectada a expressão das enzimas COX-1 e COX-2, através de imunodeteção, em células B16-F10 e SK-MEL não havendo influência do MI-D sobre esta expressão. Para o estudo da metabolização do MI-D, ensaios enzimáticos utilizando a fração microssomal de hepatócitos de camundogos induzidos com fenobarbital foram realizados para detecção de possível produto de metabolização através de análise por HPLC. Foi evidenciado um possível produto solúvel da metabolização do MI-D (MET) em 7,7 min da corrida cromatográfica com aumento de sua formação em função do tempo de incubação. O espectro do MET é semelhante ao do MI-D quando analisado na faixa entre 200 e 750 nm. Foram determinados os parâmetros cinéticos da reação por detecção de fluorescência do produto de metabolização, sendo estimado valores de $V_{\text{max}} = 1,5 \pm 0,4$ unidades de fluorescência/s e $K_m = 19,5 \pm 4,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em reação com $100 \mu\text{g}$ de proteína microssomal. Foi detectado o MET em sangue e urina de camundogos após 1 e 3 h de tratamento com MI-D (50 mg/kg). A análise por ESI+/MS do composto purificado por HPLC indica que MET apresenta 4 grupos hidroxilas adicionais ($m/z = 465$) comparado com o MI-D ($m/z = 401$). O valor estimado da DL_{50} em camundogos, para administração intraperitoneal de MI-D em DMSO/PBS 1:1 foi de $181,2 \text{ mg/kg}$. Análises histológicas de órgãos da cavidade peritoneal dos animais sobreviventes indicaram regiões com fusão de membrana serosa de diferentes órgãos e regiões com acúmulo de MI-D, sendo possível identificar grande infiltração leucocitária e formação de granulomas, com destruição de tecido de órgãos como fígado, pâncreas e intestino nas doses de 300 e 400 mg/kg . Esses resultados garantem um avanço nas pesquisas sobre os efeitos biológicos do composto e dão suporte metodológico para futuros estudos pré-clínicos a serem desenvolvidos dentro da perspectiva de estabelecimento do MI-D como uma possível droga para a quimioterapia do melanoma.

Palavras-chave: compostos mesoiônicos, Melanoma, Ciclooxigenase, Antitumoral, Prostaglandina, Metabolismo de drogas, Toxicidade, DL_{50} .

ABSTRACT

The mesoionic compound 4-phenyl-5-[4-nitrocinnamoyl]-1,3,4-thiadiazolyl-2-phenylamine chloride (MI-D) has been investigated. It shows antitumor activity in sarcoma-180, Ehrlich tumor and human and murine melanoma; analgesic, antipyretic and anti-inflammatory action *in vivo* in rats and mice with decreased levels of PGE₂. This study investigated aspects of antitumor activity related to inhibition of cyclooxygenase, drug metabolism and toxicological effects of MI-D. Evaluation of the effect of MI-D on the production of PGE₂ in murine (B16-F10) and human (SK-MEL, MEWO and MEL-85) melanoma cells was performed with 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ for 2 h, due to lack of effect on the viability of these cells in these conditions, when monitored by trypan blue and crystal violet. All cells showed production of PGE₂ after induction with arachidonic acid and quantification by immunoassay (ELISA). MI-D reduced the production of PGE₂ by 39% for SK-MEL and 57% for MEWO, but did not have effect on MEL-85. In this same condition, there was an increase in the production of PGE₂ (153%) in B16-F10 cells. It was detected the expression of COX-1 and COX-2 in B16-F10 and SK-MEL by immunodetection and MI-D had no influence on this expression. MI-D metabolism was investigated using microsomal fraction of mice hepatocytes induced with phenobarbital and detection of possible products of metabolism was performed by HPLC analysis. It was shown a possible soluble product of MI-D metabolism (MET) in 7.7 min of chromatographic run, which increased along incubation time. MET spectrum was similar to MI-D when examined in the range between 200 and 750 nm. Analysis by ESI+/MS of the purified compound by HPLC indicated that the product of metabolism has four additional hydroxyl groups ($m/z = 465$) compared to MI-D ($m/z = 401$). The kinetic parameters of reaction were determined by fluorescence detection of the product, with estimated values of $V_{\text{max}} = 1.5 \pm 0.4$ units fluorescence/s and $K_m = 19.5 \pm 4.5$ $\mu\text{mol.L}^{-1}$ in the reaction with 100 μg of microsomal protein. MET was detected in blood and urine of mice after 1 and 3 h of treatment with MI-D (50 mg/kg). The estimated value of LD₅₀ in mice for MI-D in DMSO/PBS 1:1 administered intraperitoneally was 181.2 mg/kg. Histological analysis of organs of the peritoneal cavity from survived animals, showed regions of serous membrane fusion of different organs and regions with accumulation of MI-D, and it was identified large leukocyte infiltration and formation of granulomas, with destruction of tissue in liver, pancreas and intestine at the doses of 300 and 400 mg/kg. These results provide a breakthrough in the research of the biological effects of this compound and also a methodological support for future pre-clinical studies to be developed within the context of establishment of the MI-D as a possible drug for melanoma chemotherapy.

Keywords: mesoionic compounds. Melanoma, cyclooxygenase, antitumoral, prostaglandin, drug metabolism, toxicity, LD₅₀.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESTRUTURA REPRESENTATIVA DAS CINCO CLASSES PRINCIPAIS DE COMPOSTOS MESOIÔNICOS COM ATIVIDADES BIOLÓGICAS COMPROVADAS.....	19
FIGURA 2 - (A) ESTRUTURA QUÍMICA DO CLORETO DE 4-FENIL-5-[4-NITROCINAMOIL]-1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINA (MI-D) E (B) ESTRUTURA QUÍMICA DO DERIVADO MESOIÔNICO 4-FENIL-5-[4-NITROCINAMOIL]-1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINIDA.....	21
FIGURA 3 -ESTRUTURA QUÍMICA DO 4-FENIL-5-[4-X-CINAMOIL]-1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINIDA.	21
FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DO 4-FENIL-5-[2'-Y, 4'-X, OU 4-X-CINAMOIL]-1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINIDA.....	24
FIGURA 5 - BIOCÍNTese DE PROSTAGLANDINAS E TROMBOXANOS.....	27
FIGURA 6 – CICLOOXIGENASE.....	29
FIGURA 7 - ESQUEMA DO MODELO SOBRE A RELAÇÃO DA COX-2 COM A CARCINOGENESE.....	35
FIGURA 8 - EFEITO DO MI-D SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS B16-F10.....	73
FIGURA 9 - MORFOLOGIA DE CÉLULAS B16-F10 TRATADAS COM MI-D.....	74
FIGURA 10 - EFEITO DO MI-D SOBRE A VIABILIDADE DE LINHAGENS DE CÉLULAS DE MELANOMA	75
FIGURA 11 - MORFOLOGIA DE CÉLULAS MEL-85 TRATADAS COM MI-D.....	76
FIGURA 12 – ENSAIO DE VIABILIDADE POR MÉTODO DE CRISTAL VIOLETA EM CÉLULAS DE MELANOMA TRATADAS COM MI-D.....	78

FIGURA 13 - EFEITO DO MI-D NA PRODUÇÃO DE PGE ₂ POR CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO.....	81
FIGURA 14 - EFEITO DO MI-D NA PRODUÇÃO DE PGE ₂ POR CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16-F10.....	83
FIGURA 15 - ENSAIO DE IMUNODETECÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO MI-D NO NÍVEL DE EXPRESSÃO DAS ENZIMAS COX-1 E COX-2 EM LINHAGENS DE MELANOMA	86
FIGURA 16 - ANÁLISE DA METABOLIZAÇÃO DO MI-D POR HPLC COM E SEM PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DAS PREPARAÇÕES MICROSSOMAS.....	89
FIGURA 17 - CROMATOGRAMAS APÓS POSSÍVEL METABOLIZAÇÃO DO MI-D.....	90
FIGURA 18 - VARIAÇÃO RELATIVA DAS ÁREAS DOS PICOS DE MI-D E MET EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	91
FIGURA 19 - ESPECTRO DO POSSÍVEL METABÓLITO APÓS INCUBAÇÃO EM MEIO DE REAÇÃO POR 10 MIN A 37 °C.....	92
FIGURA 20 - ESPETRO MS/MS DO COMPOSTO MET E POSSÍVEIS ESTRUTURAS DOS ÍONS FILHOS.....	94
FIGURA 21 - DETECÇÃO DE MET EM AMOSTRAS DE PLASMA E URINA DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM MI-D.....	95
FIGURA 22 - ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA DO MI-D E SEUS PRODUTOS NA PRESENÇA DA ETOXIRESORUFINA	99
FIGURA 23 - ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA DO MI-D E SEUS PRODUTOS NA PRESENÇA DA BENZOXIRESORUFINA	99
FIGURA 24 - DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS KM E Vmax.....	101
FIGURA 25 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE FÍGADO DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM MI-D EM ENSAIO DE DL ₅₀	106

FIGURA 26 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE PÂNCREAS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM MI-D EM ENSAIO DE DL50.....	107
FIGURA 27 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE RINS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM MI-D EM ENSAIO DE DL50.....	108
FIGURA 28 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE ÓRGÃOS DA CAVIDADE PERITONIAL DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM MI-D EM ENSAIO DE DL50.....	110

LISTA DE TABELAS

TABELA I - COMPARAÇÃO DOS DADOS DE INIBIÇÃO DE PRODUÇÃO DE PGE ₂ ENCONTRADOS PARA AS DIFERENTES LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO COM OS DADOS DE INIBIÇÃO DE VIABILIDADE DE Senff-Ribeiro <i>et al.</i> (2004B).....	82
TABELA II – NÚMERO DE MORTES DE CAMUNDONGOS APÓS TRATAMENTO COM MI-D.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS

APS – Persulfato de sódio

COX - Ciclooxigenase

DMSO – dimetilsulfóxido

DL₅₀ – dose letal média

EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance – “HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY”

HUVEC – células endoteliais de veia de cordão umbilical humano

IC₅₀ – concentração inibitória de 50%

MEM – meio essencial mínimo de Eagle

MET – possível produto de metabolização do MI-D

MI-D - cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinaoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamida

NADPH – forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato

PBS – solução salina-fosfato tamponada

PGE₂ – Prostaglandina E₂

PGES - Prostaglandina E₂ sintase

PGH – Prostaglandina H

RPMI – Rosewell Park Memorial Institute

S-180 – sarcoma 180

SDS – dodecil sulfato de sódio

SFB – soro bovino fetal

TEMED - N, N, N', N' tetrametiletilenodiamina

UV –radiação ultravioleta

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 COMPOSTOS MESOIÔNICOS.....	18
2.1.1. MI-D - CLORETO DE 4-FENIL-5-[4-NITROCINAMOIL]-1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINA (MI-D).....	20
2.2 CICLOOXIGENASE E DROGAS COM AÇÃO ANTITUMORAL	25
2.2.1 BIOSÍNTESE DE PROSTAGLANDINAS E PRINCIPAIS ENZIMAS ENVOLVIDAS.....	25
2.2.2 INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE PGE₂.....	30
2.2.3 COX e PGES NO CÂNCER	32
2.3 MELANOMA.....	36
2.4 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE.....	38
2.5 METABOLIZAÇÃO DE DROGAS PELO COMPLEXO CITOCROMO P450.....	40
3. JUSTIFICATIVA	45
4. OBJETIVOS.....	46
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
5.1 MATERIAIS.....	47
5.2 ANIMAIS	48
5.3 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE MI-D	48
5.4 ENSAIOS COM CÉLULAS.....	49
5.4.1 MEIOS DE CULTURA.....	49
5.4.2 SOLUÇÃO SALINA TAMPONADA (PBS).....	50

5.4.3 SOLUÇÃO DE BICARBONATO DE SÓDIO.....	50
5.4.4 TAMPÃO HEPES.....	50
5.4.5 SOLUÇÃO DE TRIPSINA-VERSENE.....	51
5.4.6 SOLUÇÃO DE EDTA EM PBS.....	51
5.4.7 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	51
5.4.8 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR	53
5.4.8.1 AZUL DE TRIPAN.....	53
5.4.8.2 CRISTAL VIOLETA	54
5.4.9 ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	54
5.4.10 ENSAIO PARA DETECÇÃO DE DE PROSTAGLANDINA E₂	55
5.4.10.1 TRATAMENTO DAS CÉLULAS.....	55
5.4.10.2 DETERMINAÇÃO DE PROSTAGLANDINA USANDO KIT “PROSTAGLANDIN E₂ EIA - MONOCLONAL”.....	55
5.4.11 IMUNODETECÇÃO DE COX-1 E COX-2	57
5.4.11.1 TRATAMENTO DAS CÉLULAS SK-MEL E B16-F10.....	57
5.4.11.2 WESTERNBLOTTING.....	58
5.4.11.2.1 SOLUÇÕES.....	58
5.4.11.2.1.1 TAMPÃO DA AMOSTRA	58
5.4.11.2.1.2 SOLUÇÃO DE POLIACRILAMIDA 30%.....	58
5.4.11.2.1.3 GEL DE POLIACRILAMIDA 10% - GEL DE CORRIDA.....	59
5.4.11.2.1.4 GEL DE POLIACRILAMIDA DE EMPILHAMENTO – “STACKING GEL”	59
5.4.11.2.1.5 TAMPÃO DE CORRIDA.....	60
5.4.11.2.1.6 SOLUÇÃO DE TRANSFERÊNCIA.....	60
5.4.11.2.1.7 TAMPÃO TRIS SALINO + TWEEN 20 (TBST)	60
5.4.11.2.1.8 TAMPÃO TRIS SALINO + TWEEN 20 -LEITE (TBST-LEITE).....	60

5.4.11.2.2 ELETROFORESE.....	61
5.4.11.2.3 TRANFERÊNCIA DAS PROTEÍNAS.....	62
5.4.11.2.4 IMUNODETECÇÃO.....	62
5.5 ENSAIOS DE METABOLIZAÇÃO DO MI-D.....	63
5.5.1 INDUÇÃO DO SISTEMA P450.....	63
5.5.2 ISOLAMENTO DA FRAÇÃO MICROSSOMAL.....	63
5.5.3 EXTRAÇÃO E DETECÇÃO DO MI-D E DE POSSÍVEIS PRODUTOS DE METABOLIZAÇÃO	64
5.5.3.1 METABOLIZAÇÃO “ <i>IN VITRO</i> ” DO MI-D	64
5.5.3.1.1 ANÁLISE POR HPLC.....	65
5.5.3.1.2 OBTENÇÃO DE ESPECTRO DO MI-D E POSSÍVEL METABÓLITO.....	66
5.5.3.1.3 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	66
5.5.3.1.4 ANÁLISE POR ESPECTROFLUORIMETRIA.....	67
5.5.3.1.4.1 METABOLIZAÇÃO DO MI-D PELO SISTEMA P450.....	67
5.5.3.1.4.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS – Km e Vmax	68
5.5.3.2 METABOLIZAÇÃO “ <i>IN VIVO</i> ” DO MI-D.....	68
5.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE “ <i>IN VIVO</i> ”.....	69
5.6.1 ENSAIO DE TOXICIDADE - DETERMINAÇÃO DA DL ₅₀	69
5.6.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	70
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	70
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
6.1 ENSAIOS COM CÉLULAS DE LINHAGENS DE MELANOMA.....	72
6.1.1 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	72
6.1.2 EFEITO DO MI-D NA PRODUÇÃO DE PGE ₂ E EXPRESSÃO DA COX-1 E COX-2 POR CÉLULAS DE MELANOMA.....	79
6.2 ENSAIOS DE METABOLIZAÇÃO DO MI-D.....	87

6.2.1 ANÁLISE DE METABOLIZAÇÃO DO MI-D E SEPARAÇÃO E DETECÇÃO DE POSSÍVEL METABÓLITO POR HPLC.....	88
6.2.2 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	93
6.2.3 ANÁLISE DA METABOLIZAÇÃO DO MI-D <i>IN VIVO</i>.....	95
6.2.4 ANÁLISE DE METABOLIZAÇÃO DO MI-D POR ESPECTROFLUORIMETRIA.....	97
6.2.4.1 IDENTIFICAÇÃO DA METABOLIZAÇÃO	97
6.2.4.2 DETERMINAÇÃO DOS PARAMETROS CINÉTICOS KM E VMAX.....	100
6.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE “<i>IN VIVO</i>”	102
6.3.1 ENSAIOS DE DOSE LETAL MÉDIA (DL₅₀)	102
6.3.2 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS	104
7. CONCLUSÕES.....	113
REFERÊNCIAS.....	114
ANEXO.....	131

1. INTRODUÇÃO

Compostos heterocíclicos desempenham importantes papéis nos processos bioquímicos, sendo determinantes nas estruturas e funções de moléculas essenciais como DNA, RNA, proteínas, vitaminas, coenzimas, hormônios neurotransmissores, assim como, em compostos naturais ou sintetizados utilizados como drogas, tais como antibióticos, alcalóides, glicosídeos, pesticidas, entre muitos outros. Inspiradas neste contexto, as pesquisas farmacêuticas têm constantemente desenvolvido novos compostos heterocíclicos com importantes ações biológicas (BALABAN *et al.*, 2004). O composto mesoiônico, objeto deste estudo, faz parte desta classe e desde 1996, o estudo das propriedades biológicas e potencial aplicação desses compostos constituem uma das linhas de trabalho do Núcleo de Pesquisas em Bioenergética e Bioquímica Farmacológica no Laboratório de Oxidações Biológicas e de Cultivo Celular da UFPR. Particularmente, o composto mesoiônico, cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinaíloil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D), sintetizado no Departamento de Química da UFRRJ (GRYNBERG *et al.*, 1997), vem sendo avaliado.

Os resultados de Grynberg *et al.* (1997) forneceram as primeiras evidências da ação antitumoral do MI-D em sarcoma (S-180) e tumor de Ehrlich, quando administrado em veículo DMSO 80% em solução salina, intraperitonealmente em camundongos, nas doses de 30 e 25 mg/kg, respectivamente. A ação antitumoral do MI-D em melanoma murino (B16-F10), tumor mais agressivo e metastático, foi avaliada por Senff-Ribeiro e colaboradores em 2003. Nesse estudo foi demonstrada a atividade do MI-D sobre a viabilidade e proliferação celular de linhagem celular de B16-F10 e inibição do crescimento de tumor já instalado em camundongo. Os efeitos antitumorais do composto foram comparados com outros derivados mesoiônicos (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004a) e com compostos antineoplásicos de uso corrente, utilizando linhagem celular B16-F10, onde o MI-D mostrou-se mais eficiente. Em

diferentes linhagens de melanoma humano (MEL-85, SK-MEL, A2058 e MEWO), o MI-D demonstrou uma elevada atividade citotóxica. A adesão das células da linhagem MEL-85 a diferentes componentes da matriz extracelular foi avaliada em presença do MI-D, sendo que o composto reduziu a adesão à laminina, fibronectina e matrigel. Foi também observada alteração da morfologia e organização dos filamentos de actina do citoesqueleto (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004b). Em adição a estes trabalhos, outro estudo em camundongos demonstrou que o composto MI-D possui ação analgésica e antiinflamatória *in vivo*, na dose de 8 mg/kg e atividade antipirética na dose de 1 mg/kg. Tais efeitos foram decorrentes da diminuição dos níveis de PGE₂, sugerindo a inibição da COX-2 (CARDOSO *et al.*, 2004).

Considerando que o melanoma é um tumor agressivo com alto potencial para formação de metástase e que os tratamentos nessas condições disseminadas são apenas paliativos e com péssimo prognóstico, o estudo de novas drogas é de extrema importância na busca do desenvolvimento de tratamentos mais eficientes. O MI-D apresentou excelentes resultados prévios, criando grandes perspectivas de utilização do composto na terapia antitumoral, porém são poucos os estudos em relação a sua forma de ação. Aspectos em relação a confirmação dos efeitos do MI-D sobre a produção de PGE₂ e expressão da COX-1 e COX-2 em linhagens tumorais e de estudos pré-clínicos ainda não foram abordados dentro dos estudos já realizados com esta droga. Portanto, reconhecendo a grande relevância da continuidade dos estudos em relação ao mecanismo de ação do MI-D, foi proposto o presente estudo de investigação sobre aspectos da atividade antitumoral relacionada à inibição da ciclooxigenase, assim como a avaliação toxicológica e a investigação da metabolização do MI-D.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 COMPOSTOS MESOIÔNICOS

Os compostos mesoiônicos apresentam características estruturais de interesse na bioquímica médica. Seu potencial valor como substância biologicamente ativa se deve ao seu caráter aromático, seu tamanho relativamente pequeno e a possibilidade de selecionar diferentes sistemas mesoiônicos, ao variar-se a composição dos anéis heterocíclicos (KIER e ROCHE, 1967).

A definição do termo mesoiônico, dada por Baker and Ollis (1955), compreende os compostos com as seguintes características: a) anel aromático heterocíclico contendo cinco ou seis membros que não pode ser representado por uma estrutura covalente; b) todos os átomos do anel fornecem elétrons π para formar um sexteto; c) o anel apresenta uma carga parcial positiva, balanceada por uma correspondente carga negativa em um átomo ou grupo exocíclico; d) o anel possui característica planar e considerável energia de ressonância. Posteriormente, este conceito foi modificado, sendo proposta a seguinte definição: "Um composto pode ser apropriadamente denominado mesoiônico se for constituído por um anel heterocíclico formado de cinco membros, o qual não pode ser representado satisfatoriamente por uma estrutura covalente ou polar e, possuir um sexteto de elétrons em associação com os cinco átomos do anel" (OLLIS e RAMSDEN, 1976).

A composição atômica do anel aromático dos compostos mesoiônicos é utilizada para a sua classificação, podendo ser encontrados átomos de carbono, oxigênio, nitrogênio e enxofre. Utilizando este critério de classificação, os compostos mesoiônicos com atividades biológicas comprovadas podem ser agrupados em cinco classes principais; as sidnonas (1,2,3-oxadiazólio-5-olato), as sidnoniminas (1,2,3-

oxadiazólio-5-aminida), isosidnonas (1,3,4-oxadiazólio-2-ona), os oxatriazóis e os 1,3,4-tiadiazóis (KIER e ROCHE, 1967) (Figura 1).

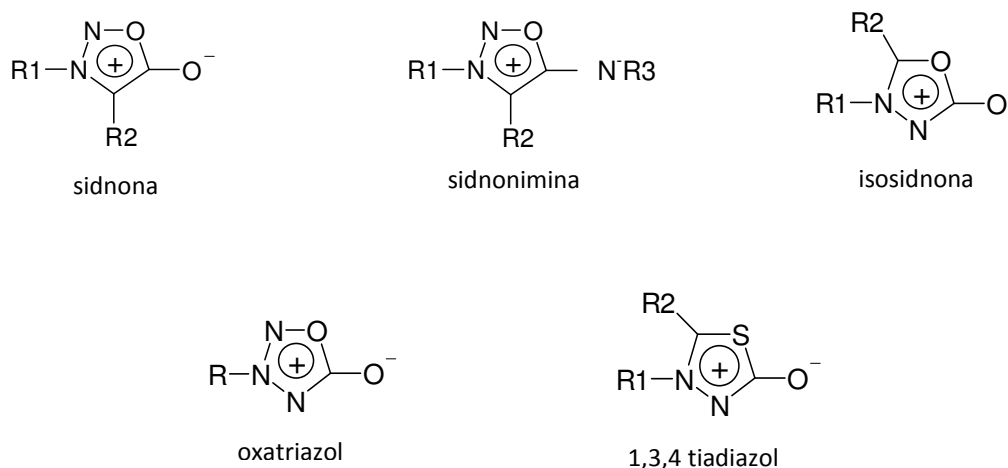


FIGURA 1 - ESTRUTURA REPRESENTATIVA DAS CINCO CLASSES PRINCIPAIS DE COMPOSTOS MESOIÔNICOS COM ATIVIDADES BIOLÓGICAS COMPROVADAS.
FONTE: Ollis e Ramsden (1976)

A presença de cargas positiva e negativa nestes compostos possibilita sua interação com biomoléculas como proteínas e DNA e, por outro lado, a eletroneutralidade associada a um caráter hidrofóbico permite sua passagem através de membranas biológicas (OLLIS e RAMSDEN, 1976; NEWTON e RAMSDEN, 1982). Outra característica química importante para a atividade dos compostos mesoiônicos é a presença de diferentes grupos substituintes, que são também responsáveis pelas diferenças no tipo de atividade do composto ou na intensidade de seus efeitos (GLENNON *et al.*, 1981; GRYNBERG *et al.*, 1992; SEN *et al.*, 1993; MONTANARI *et al.*, 1997; GRYNBERG *et al.*, 1997; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004a).

No estudo de novas drogas, a molécula em estudo deve ser avaliada em relação a uma ampla variedade de ações, visando o estabelecimento da seletividade da droga. Em relação aos diversos compostos mesoiônicos já sintetizados, muitos efeitos biológicos já foram verificados. Para as sidnonas foram reconhecidas as atividades antimalárica (NYBERG e CHENG, 1965), antibacteriana, antifúngica

(KAVALI *et al.*, 2000) e antitumoral (DUNKLEY e THOMAN, 2003; GRYNBERG *et al.*, 1992). Os compostos sidnoniminas têm despertado atenção quanto à ação no sistema circulatório, apresentando efeitos vasodilatadores e hipotensores (MAJID *et al.*, 1980; RUDOLPH e DIRSCHINGER, 1991). Atuam também como inibidores de agregação plaquetária (REHSE *et al.*, 1993a; REHSE *et al.*, 1993b; REHSE *et al.*, 1993c) e anticoagulantes (REHSE *et al.*, 1993a; REHSE *et al.*, 1993c). Os compostos isosidnominas foram identificados como agentes antibióticos (MONTANARI *et al.*, 1996). Os compostos oxatriazóis apresentam efeito hipotensor (KIER e ROCHE, 1967), inibitório da agregação plaquetária e são doadores de óxido nítrico (KANKAANRANTA *et al.*, 1996). As ações farmacológicas de compostos 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida foram analisadas e se mostraram dependentes dos substituintes na estrutura, sendo identificados como agentes antibióticos (LIMA *et al.*, 1986; MONTANARI *et al.*, 1992; MONTANARI *et al.*, 1997), inibidores da fosfodiesterase do AMPcíclico (GLENNON *et al.*, 1981), desacopladores da fosforilação oxidativa (CADENA *et al.*, 1998; CADENA *et al.*, 2002), agentes anti-inflamatórios (CARDOSO *et al.*, 2004) e antitumorais (GRYNBERG *et al.*, 1997; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2003; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004a ; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004b).

2.1.1. MI-D - CLORETO DE 4-FENIL-5-[4-NITROCINAMOIL]-1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINA (MI-D)

O composto cloreto de 4-fenil-5-[4-nitrocinaoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-D), quando desprotonado origina o composto mesoiônico 4-fenil-5-[4-nitrocinaoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminida pertencente à classe 1,3,4 – tiadiazólio-2-aminida (Figura 2).

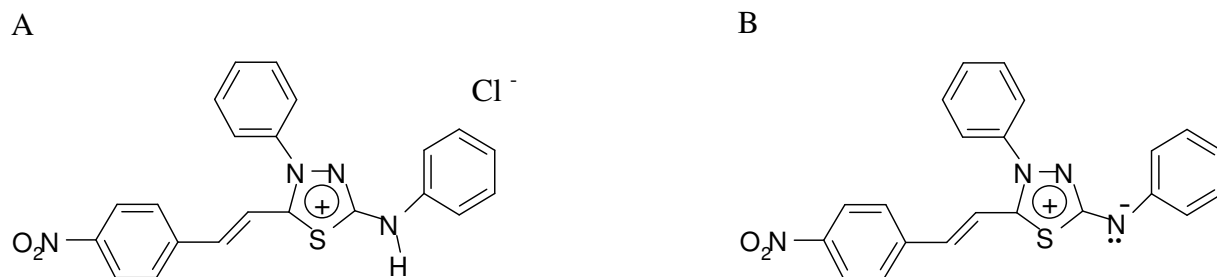


FIGURA 2 - (A) ESTRUTURA QUÍMICA DO CLORETO DE 4-FENIL-5-[4-NITROCINAMOIL]-1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINA (MI-D) E (B) ESTRUTURA QUÍMICA DO DERIVADO MESOIÔNICO 4-FENIL-5-[4-NITROCINAMOIL]-1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINIDA.
 FONTE: Grynberg *et al.* (1997)

Os resultados de Grynberg *et al.* (1997) forneceram as primeiras evidências da ação antitumoral do MI-D em S-180 e tumor de Ehrlich, quando administrado intraperitonealmente em veículo DMSO 80% em solução salina, em camundongos, nas doses de 30 e 25 mg/kg, respectivamente. Nesse estudo, o efeito antitumoral do MI-D foi comparado a outros mesoiônicos sintetizados. Os compostos 4-fenil-5-[4-X-cinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamida, onde X = OH, H ou OCH₃ (Figura 3). O efeito citotóxico quando X=OH foi semelhante ao observado para o MI-D, porém os derivados com X=H e X=OCH₃ não apresentaram efeito antitumoral nas condições testadas. Os autores sugeriram que a presença de substituintes mais polares aumenta a atividade antitumoral destes compostos.

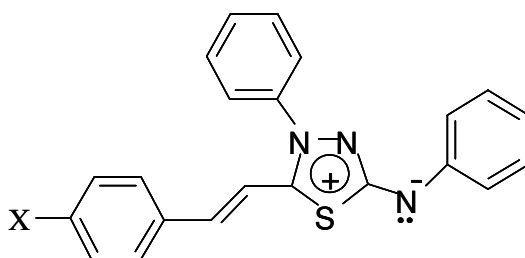


FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DO 4-FENIL-5-[4-X-CINAMOIL]-1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINIDA.
 FONTE: Grynberg *et al.* (1997)

Devido a importante ação antitumoral relatada por Grynberg *et al.* (1997) e a reconhecido envolvimento das mitocôndrias nos mecanismos de morte celular (PETIT *et al.*, 1996; KLAMT *et al.*, 2005; CHIRUVELLA *et al.*, 2008), MI-D teve seus efeitos avaliados sobre a bioenergética mitocondrial. Cadena *et al.* (1998) caracterizaram o efeito desacoplador do MI-D em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Os autores demonstraram redução da eficiência da fosforilação oxidativa com diminuição do controle respiratório e razão ADP/O. Avaliações dos complexos da cadeia respiratória sugeriram que os sítios de inibição do MI-D encontram-se após o complexo I e entre os complexos II e III. O MI-D causou o colapso do potencial elétrico transmembrana ($\Delta\psi_m$). Em relação à atividade da ATPase, em mitocôndrias intactas, o composto promoveu aumento da atividade, mas inibição em mitocôndrias desacopladas por carbonil cianeto p-trifluormetoxifenilhidrazona (FCCP).

Baseado em experimentos de inchamento mitocondrial induzido por valinomicina mais K^+ e nigericina mais K^+ e polarização de fluorescência das sondas DPH e DPH-PA em vesículas multilamelares sintéticas (DMPC) e mitocondriais, foi demonstrado que o MI-D é capaz de afetar a fluidez e a elasticidade da membrana (CADENA *et al.*, 2002). Os autores sugeriram que os efeitos provocados na membrana mitocondrial e na transdução de energia poderiam estar envolvidos no mecanismo pelo qual o MI-D induz a morte em células tumorais.

A ação antitumoral do MI-D em melanoma murino (B16-F10), tumor mais agressivo e metastático, foi avaliada por Senff-Ribeiro e colaboradores (2003). Os autores avaliaram os efeitos do MI-D sobre a viabilidade e proliferação celular de linhagem celular e inibição do crescimento do tumor *in vivo* em camundongo. Nesse trabalho, as células tratadas com MI-D apresentaram perda de viabilidade, dependente do tempo e da concentração da droga. Este efeito foi observado a partir de 1 h de tratamento com $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MI-D. A morte celular foi total após 24 h de tratamento na concentração de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ da droga. O MI-D foi mais eficaz que o antineoplásico fotemustina que apresentou discreto efeito na viabilidade nas mesmas condições de tratamento, sendo que as células mantiveram 90% da

viabilidade após 48 h em contato com $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$ deste composto. Em relação aos efeitos proliferativos, células tratadas com 2,5 e $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MI-D sofrem diminuição da capacidade proliferativa e o tratamento com $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ da droga causou a completa inibição da capacidade proliferativa após 48 h de tratamento. Os ensaios *in vivo*, foram realizados em camundongos C57BL/6 inoculados com células de melanoma B16-F10. O MI-D (25 mg/kg) apresentou uma potente atividade antitumoral, inibindo o crescimento do tumor em 85% quando o tratamento foi realizado em dose única, intraperitoneal, 24 horas após da inoculação das células tumorais. Nestas condições, o composto foi mais eficaz que os antineoplásicos fotemustina (inibição de 50% do crescimento tumoral) e dacarbazina (inibição de 27% do crescimento tumoral) aplicados nas mesmas concentrações ($57 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Em uma segunda etapa, em ensaio com tumor já desenvolvido, foi realizado tratamento com administração peritoneal em três doses de 25 mg/kg de MI-D nos dias 8, 9 e 10 após a inoculação das células de melanoma. Nestas condições, o MI-D foi eficiente em inibir em 64% o crescimento tumoral (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2003). Estes resultados levaram os autores a considerar o MI-D como uma droga promissora e atraente para futuros ensaios clínicos em tratamentos do melanoma.

Os efeitos antitumorais do composto foram comparados com outros derivados mesoiônicos da classe 1,3,4 tiadiazol (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004a). Neste estudo, o efeito da série de compostos 4-fenil-5-[2'-Y, 4'-X, ou 4-X-cinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminida (Figura 4), onde MI-J (X=OH), MI-2,4diF (X=Y=F), MI-4F (X=F) e MI-D (X=NO₂) foi testada em células de melanoma murino B16-F10 *in vitro* e após implantação em camundongos C57BL/6. Os autores demonstraram que os compostos MI-D, MI-2,4diF e MI-4F foram capazes de diminuir a viabilidade das células desta linhagem, destacando o composto MI-D como o mais eficiente. O mesoiônico MI-J não apresentou efeito sobre a viabilidade destas células nas mesmas condições de tratamento. Em ensaios *in vivo*, o MI-D foi o único composto capaz de causar inibição do crescimento tumoral. Os autores atribuíram a maior eficiência do MI-D na ação antitumoral à presença de maior carga positiva no anel

mesoiônico garantida devido ao grande poder eletrôn-atraente do grupo nitro ligado ao grupamento cinamoil do composto.

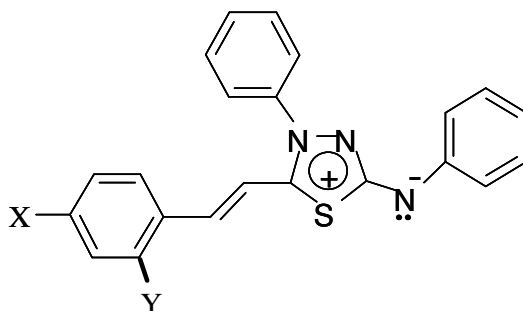


FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DO 4-FENIL-5-[2'-Y, 4'-X, OU 4-X-CINAMOIL]-1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINIDA
FONTE: Dos Santos e Echevarria (2001)

Em estudo com diferentes linhagens de melanoma humano (MEL-85, SK-MEL, A2058 e MEWO), o MI-D demonstrou uma elevada atividade citotóxica (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004b). O tratamento com $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ foi capaz de reduzir a viabilidade das células MEL-85, A2058 e MEWO para 56%, 30% e 23% após 24 h de tratamento, respectivamente. Para SK-MEL, um efeito semelhante (30%) foi atingido com uma concentração de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MI-D no mesmo período de tratamento. Em relação a capacidade de proliferação, o MI-D, mesmo em concentrações bastante baixas ($2,5$ e $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$), foi capaz de inibir a proliferação de todas as linhagens de melanoma testadas. Neste estudo, a adesão das células MEL-85 a diferentes componentes da matriz extracelular também foi avaliada. A presença do MI-D reduziu a adesão das células à laminina e fibronectina a partir de dose de $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e ao matrigel em dose de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, após 2 horas, assim como, ocorreu alteração da morfologia e organização dos filamentos de actina do citoesqueleto em tratamento com $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MI-D por 2 horas (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004b). Estes resultados motivaram a solicitação de patente desta atividade, com registro de pedido número 000977 (01/07/2004).

Em adição a estes trabalhos e sob outro enfoque, Cardoso *et al.*, (2004) desenvolveram estudos do efeito do MI-D *in vitro* sobre o metabolismo hepático, sobre a produção de íons superóxidos e óxido nítrico e *in vivo* avaliando potencial antinociceptivo, antipirético e antiinflamatório do composto. Em fígado perfundido de rato, o MI-D aumentou a glicogenólise e inibiu o consumo de oxigênio. Em macrófagos estimulados por forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), o composto foi capaz de inibir a produção de íon superóxido, mas não alterou a produção de óxido nítrico. Em ratos, o MI-D (2 mg/kg) foi capaz de inibir o número de contrações abdominais induzidas por ácido acético. Em concentração de 1 mg/kg, foi capaz de inibir a resposta febril induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e também de reduzir a temperatura (febre estabelecida). Na mesma concentração o composto diminuiu em 67% os níveis de prostaglandina (PGE₂) em fluído cerebrospinal de camundongos expostos a LPS e em concentração de 8 mg/kg o composto diminuiu a formação de edema de pata induzido por carragenana. Segundo os autores, os resultados obtidos caracterizam um espectro de atividades semelhantes a compostos antiinflamatórios não esteróides, qualificando o MI-D como uma droga antiinflamatória.

2.2 CICLOOXIGENASE E DROGAS COM AÇÃO ANTITUMORAL

2.2.1 BIOSSÍNTESE DE PROSTAGLANDINA E PRINCIPAIS ENZIMAS ENVOLVIDAS

Os compostos prostanóides, prostaglandinas e tromboxanos, são produtos derivados de ácidos graxos poli-insaturados pela ação das ciclooxigenases (Figura 3). As prostaglandinas contêm um anel ciclopentano e duas cadeias ligadas ao anel.

Conforme as modificações do anel ciclopentano elas são classificadas em tipos A-I, sendo que os tipos A, B e C não são encontrados naturalmente. As prostaglandinas G e H apresentam o mesmo anel, mas diferem no fato do carbono 15 conter um grupo hidroperóxido e hidróxido ligado, respectivamente. As prostaglandinas são também classificadas em séries (1, 2 e 3) baseadas no número de duplas ligações em suas cadeias. As prostaglandinas da série 1 contêm uma dupla ligação 13-*trans*, as prostaglandinas da série 2 contêm duas duplas ligações, 5-*cis* e 13-*trans*, e as prostaglandinas da série 3 apresentam três duplas ligações, 5-*cis*, 13-*trans*, and 17-*cis*. As prostaglandinas derivadas de ácido araquidônico são da série 2 e são predominantes nos mamíferos (NARUMIYA *et al.*, 1999).

A ciclooxigenase (COX), também chamada de prostaglandina H sintase ou prostaglandina endoperóxido sintase, é uma oxigenase de ácidos graxos da superfamília das mieloperoxidases (DAIYASU e TOH, 2000). Apresenta duas atividades catalíticas, ciclooxigenase e peroxidase. A atividade ciclooxigenase de ácidos graxos atua na oxigenação de ácidos graxos poliinsaturados, tendo como substrato preferencial o ácido araquidônico, formando endoperóxido cíclico, a prostaglandina G (PGG₂). A atividade peroxidase de endoperóxido atua sobre o produto da reação da ciclooxigenase, o qual é reduzido, formando prostaglandina H (PGH₂) (FOEGH e RAMWELL, 2006). O endoperóxido PGH₂ constitui substrato intermediário para a síntese de substâncias biologicamente ativas, as diferentes prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina através de vias separadas (FOEGH e RAMWELL, 2006; HECKER *et al.*, 1998) como demonstrado na figura 5.

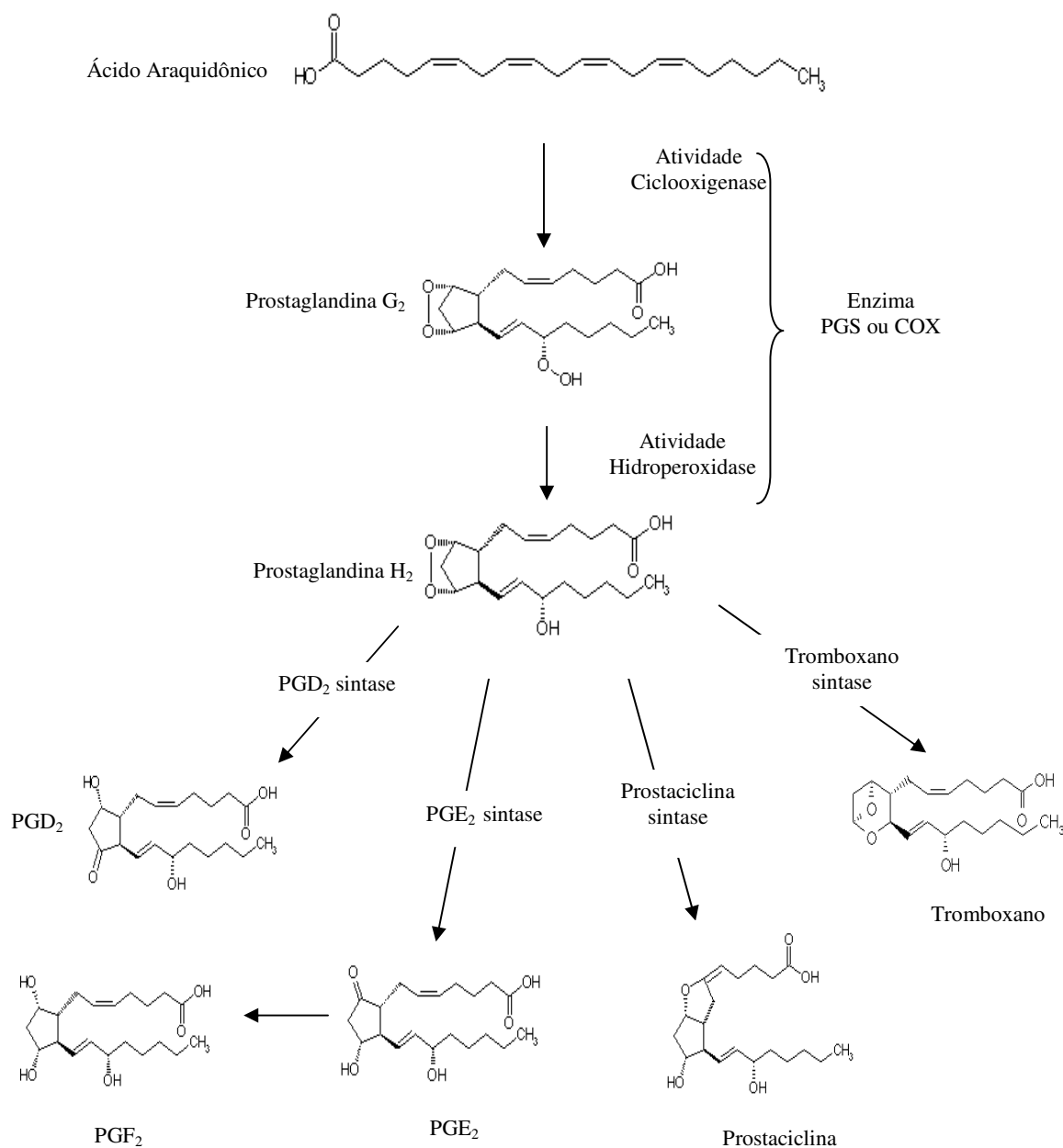


FIGURA 5 - BIODISSÍNTESE DE PROTAGLANDINAS E TROMBOXANOS
 FONTE: Hecker *et al.* (1998)

Duas isoformas importantes da COX foram identificadas. Hla e Neison (1992) demonstraram que o cDNA da COX-2 humana codifica um polipeptídeo de 604 aminoácidos 61% idêntico ao polipeptídeo da COX-1 humana. Também demonstraram que a COX é codificada por dois genes expressos em vários tipos

celulares e regulados de forma diferenciada, com alto nível de indução do transcrito COX-2 em células inflamatórias mesenquimais, indicando seu papel no processo inflamatório.

A isoforma COX-1 é expressa de forma constitutiva em células e tecidos de mamíferos (CHANDRASEKHARAN e SIMMONS, 2004), enquanto a COX-2 geralmente está presente em tecidos de mamíferos em baixos níveis, mas é altamente induzível e têm seus níveis aumentados perante um ou mais estímulos, tais como citocinas e fatores de crescimento (CHANDRASEKHARAN e SIMMONS, 2004). Exceções são observadas em porções do sistema nervoso central, rins (HODGSON e LEVI, 1994; HECKER *et al.*, 1998) e vesículas seminais (HODGSON e LEVI, 1994; HECKER *et al.*, 1998; H'ETU e RIENDEAU, 2005), onde a COX-2 é expressa constitutivamente em altos níveis.

Enzimas COX humana (LUONG *et al.*, 1996) e murina (KURUMBAIL *et al.*, 1996) foram cristalizadas e mostraram estruturas extremamente similares. A estrutura da enzima consiste de três domínios distintos: um domínio *N*-terminal fator de crescimento epidermal, seguido de um motivo de ligação à membrana (Mb) formado de quatro hélices (A-D) e um domínio catalítico *C*-terminal, onde estão localizados os sítos ativos da ciclooxygenase (Cx) e da peroxidase (Px) (LUONG *et al.*, 1996; KURUMBAIL *et al.*, 1996). O domínio catalítico é formado por um estreito canal hidrofóbico que se abre no domínio de ligação à membrana, constituído por estruturas em alfa-hélice e um motivo heme ligado. Este sítio recebe o ácido araquidônico liberado diretamente da membrana por fosfolipases (CHANDRASEKHARAN e SIMMONS, 2004). O sítio catalítico peroxidase está localizado na superfície interna da membrana, voltado para o interior do retículo endoplasmático, como demonstrado na figura 6.

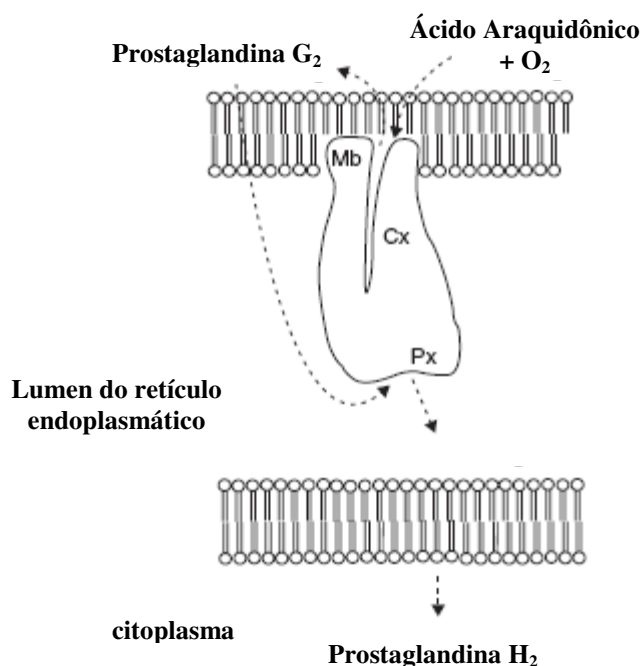


FIGURA 6 - CICLOOXIGENASE

FONTE: Chandrasekharan e Simmons (2004)

NOTA: Esquema demonstrando posicionamento da ciclooxygenase, em corte, no lúmen do retículo endoplasmático, identificando localização dos sítios catalíticos: Cx, sítio catalítico da ciclooxygenase e Px, sítio catalítico peroxidase e Mb, domínio de ligação a membrana.

A prostaglandina PGE_2 , formada a partir da PGH_2 , apresenta como principais efeitos biológicos, a indução de vasodilatação, indução de efeitos do processo inflamatório, regulação da produção de uma variedade de citocinas, como $TNF-\alpha$ e IL-6 e contração da musculatura lisa (BOS *et al.*, 2004). Esta molécula atua de modo autócrino e parácrino, interagindo com suas células alvos através de ligação à receptores de superfície celular, ligados a proteína G. Os receptores para prostaglandina E_2 (PGE_2), conhecidos são: EP_1 , EP_2 , EP_3 e EP_4 ; cada um deles ativa vias distintas de sinalização. O receptor EP_1 está acoplado a ativação da fosfolipase C; os receptores EP_2 e EP_4 , estão ligados a estimulação da adenilato ciclase e o receptor EP_3 parece ter múltiplos efeitos, dependentes da concentração, podendo estar relacionado à inibição ou ativação da adenilato ciclase (FOEGH e RAWELL, 2006).

Outra enzima envolvida na síntese de PGE_2 é a PGE_2 sintase (PGES). A atividade PGE_2 sintase é desenvolvida por duas formas de proteínas: PGES ligada a membrana (mPGES) e PGES citoplasmática (cPGES). As duas enzimas representam rotas diferentes para a produção de PGE_2 , relacionadas a atividade das duas isoformas da COX: uma rota constitutiva, relacionada a atividade da COX-1 (COX-1- cPGES) (MURAKAMI *et al.*, 2002) e uma rota induzível, relacionada a atividade da COX-2 (COX-2- mPGES) (MURAKAMI *et al.*, 2000; STICHTENOTH *et al.*, 2001; MANCINI *et al.*, 2001). CLAVEAU *et al.* (2003) observaram através de ensaios de expressão induzida, que a expressão da isoforma mPGES-1 , mas não da mPGES-2 , está acoplada a indução de expressão da COX-2.

2.2.2 INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE PGE_2

A inibição da produção de PGE_2 pode ocorrer por diminuição na expressão da enzima COX (XU *et al.*, 1999; KUNDU *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2007) ou por inibição da atividade enzimática da COX sem alteração da sua expressão (HAMILTON *et al.*, 1999). Os inibidores das ciclooxigenases podem ser identificados quanto a forma de ação: 1) inibição irreversível: age em ambas as isoformas por promover modificação química através de acetilação de uma serina na posição 529 da cadeia polipeptídica, no interior do sítio ativo da enzima, o que interfere com a ligação do ácido araquidônico, sendo o ácido acetilsalicílico um exemplo de inibidor dessa classe (CHANDRASEKHARAN e SIMMONS, 2004). 2) inibição reversível competitiva de ambas as isoformas, o mefenamato e o ibuprofeno são exemplos de inibidores que agem dessa forma; 3) inibição dependente do tempo, na qual ocorre aumento do potencial inibitório de acordo com o aumento do tempo de pré-incubação da molécula inibitória com a enzima, sem que ocorra alteração estrutural da molécula inibitória após sua recuperação do meio (KULMACZ e LANDS, 1985), a interação do

inibidor com a enzima ocorre por formação de uma ponte salina entre um carboxilato da droga e uma arginina na posição 120 da hélice D da enzima, causando alteração conformacional da molécula. São exemplos de inibidores deste grupo o flurbiprofeno e a indometacina (BHATTACHARYYA *et al.*, 1996; KURUMBAI *et al.*, 1996); 4) Inibição seletiva e dependente do tempo da COX-2. Este grupo é formado de moléculas que atuam como inibidores competitivos fracos das duas isoformas quando incubados simultaneamente ao substrato. Porém, quando realizada incubação prévia do inibidor com a enzima ocorre a manutenção da inibição competitiva fraca da COX-1 e um aumento do potencial inibitório, de forma dependente do tempo, da COX-2 (COPELAND *et al.*, 1994). Um exemplo deste grupo de inibidores é o composto SC-558 ([5-(4-bromophenyl)-3-trifluoromethyl-1H-pyrazol-1-yl] benzenesulfonamide) (KURUMBAI *et al.*, 1996).

Apesar das estruturas das isoformas 1 e 2 da COX serem altamente conservadas, ensaios de mutação realizados por GIERSE *et al.* (1996) observaram que a substituição do aminoácido Valina, encontrado na posição 509 da cadeia polipeptídica no interior do sítio ativo da COX-2, por um aminoácido Isoleucina (correspondente ao aminoácido isoleucina na posição 523 da COX-1) causou alteração do padrão inibitório, onde inibidores seletivos para COX-2 passaram a atuar com padrão de inibição competitiva, semelhante para COX-1 e COX-2. Estes dados indicam que a variação de um único aminoácido no sítio ativo destas enzimas determina a inibição seletiva da COX-2. A variação de um grupo metileno, presente na isoleucina e ausente na valina, permite que o inibidor tenha acesso a um canal adicional na COX-2 que abre diretamente para o meio, onde o inibidor seletivo da COX-2 pode se ligar (KURUMBAI *et al.*, 1996).

2.2.3 COX e PGES NO CÂNCER

A super-expressão da COX-2 tem sido associada com o desenvolvimento do câncer (AN *et al.*, 2002), angiogênese e crescimento tumoral (WILLIAMS *et al.*, 2000; SENO *et al.*, 2002; AMANO *et al.*, 2003; DANDEKAR e LOKESHWAR, 2004; ALI *et al.*, 2007). A função citoprotetora para célula tumoral, atribuída à PGE₂, está associada com a indução da proliferação celular (DANDEKAR e LOKESHWAR, 2004), aumento da produção de proteínas antiapoptóticas (CHANG *et al.*, 2000; DANDEKAR e LOKESHWAR, 2004), diminuição da produção de proteínas pró-apoptóticas (TANG *et al.*, 2002; Dandekar e Lokeshwar, 2004) e diminuição da atividade das caspases (CHANG *et al.*, 2000; DANDEKAR e LOKESHWAR, 2004; TANG *et al.*, 2002).

Análises de tecidos tumorais gástricos sugerem que a expressão de COX-2 contribui para o desenvolvimento de câncer gástrico por induzir angiogênese e inibir apoptose, porém esta relação não esteve presente em 100% dos casos (TATSUGUCHI *et al.*, 2004).

Willian *et al.* (2000) avaliaram a contribuição da COX-1 e COX-2, produzidas nos tecidos de camundongos, no crescimento de carcinoma de pulmão (LLC) implantado em camundongo. Foram comparados os resultados com animais onde foi realizada supressão de COX-1 (COX-1^{-/-}) e COX-2 (COX-2^{-/-}), encontrando diminuição do crescimento tumoral em animais COX-2^{-/-}, mas não em animais COX-1^{-/-}. Foi observada, também, a diminuição da densidade vascular e de produção do Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) nos animais COX-2^{-/-}, resultado bastante semelhante ao encontrado para animais tratados com inibidor seletivo para COX-2.

Estudos com cDNA antisense de COX-2 em linhagem celular de câncer de próstata mostraram o efeito protetor da COX-2 para células tumorais através da supressão da enzima *in vitro*, com efeito na redução da proliferação celular, aumento

da apoptose, aumento da atividade caspase-3, aumento da proteína Bax e diminuição da proteína Bcl-xL. *In vivo*, tumores com cDNA antisense resultaram em inibição do crescimento tumoral, aumento de apoptose e diminuição de angiogênese. Com estes resultados, os autores concluíram que a expressão constitutiva da COX-2 no câncer de próstata apresenta funções citoprotetoras e de indução de angiogênese (DANDEKAR e LOKESHWAR, 2004).

Inúmeros estudos têm evidenciado o efeito protetor de drogas antiinflamatórias não esteroidais, as quais inibem a COX-2 no câncer (ABDALLA *et al.*, 2005; ZHA *et al.*, 2004; DING *et al.*, 2003; HLA *et al.*, 1999). Diferentes inibidores da enzima COX apresentam diferentes efeitos sobre a mitose de células intestinais. Experimentos com linhagens de células intestinais de rato (IEC-18) e de câncer de cólon em rato (WB-2054) demonstraram que inibidores específicos da COX-2, mas não da COX-1, inibem a incorporação de timidina tritiada, diminuem proliferação celular e aumentam a taxa de apoptose (ERICKSON *et al.*, 1999).

Em ensaios *in vitro*, Ali *et al.* (2007) identificaram a ação do composto SNS-032, inibidor da COX-2, na diminuição da viabilidade e proliferação celular em células endoteliais de veia de cordão umbilical humano (HUVECs) e células de glioma humano (U87MG). Os autores também demonstraram a inibição da migração e formação de rede capilar pelas células endoteliais e inibição da produção de VEGF por ambas as linhagens celulares, concluindo que o inibidor da COX-2 impede a angiogênese *in vitro* e esta ação está associada ao bloqueio da produção de VEGF.

Amano *et al.*, (2003), identificaram que inibidores específicos de COX-2, mas não da COX-1, causam diminuição da angiogênese em camundongos implantados com células de Sarcoma-180. Em animais com supressão do receptor para prostaglandina (EP3), os autores demonstraram diminuição do crescimento tumoral, da angiogênese e da produção de VEGF, assim como demonstraram que o crescimento tumoral e a angiogênese nestes animais não são influenciados por antagonista de EP3, quando comparados a animais controles (com expressão de EP3). Estes resultados demonstram a participação das células do estroma na

sinalização para o crescimento tumoral e angiogênese, assim como, indicam que a via de sinalização através do receptor EP3 é importante na indução da produção do fator de crescimento VEGF pela prostaglandina. Além disso, foi mostrado que células tumorais migram em resposta a PGE_2 (MA *et al.*, 2006) e inibidores da COX-2 podem diminuir a expressão de algumas moléculas de adesão, como aquelas envolvidas na adesão dos leucócitos durante as respostas imunológicas e inflamatórias (SAKAI, 1996).

Com base em inúmeros estudos que analisam a relação entre COX-2 e carcinogênese, Zha *et al.*, (2004) propuseram um modelo para a atuação da COX-2 na carcinogênese (Figura 5). Neste modelo, ocorreria uma relação interativa entre células tumorais, endoteliais e células do infiltrado inflamatório no local onde o tumor se originou. Segundo o modelo, a alta concentração de prostaglandina no local resultaria da presença dos três tipos celulares citados, além da possível contribuição de células do estroma. O constante “feedback” positivo dos receptores de prostaglandina, aumentaria a expressão da COX-2 e asseguraria a produção contínua de prostaglandina. Nas células tumorais, a prostaglandina também sinalizaria para a produção de múltiplos fatores de angiogênese garantindo a formação de vasos no local do tumor e a produção de fatores anti-apoptóticos. Nas células inflamatórias, a sinalização da prostaglandina estimularia a formação de moléculas pró-inflamatórias, tais como interleucina 2, as quais recrutariam monócitos da circulação, ampliando a resposta inflamatória. Como a resposta iria promover o aumento dos níveis de prostaglandina, fatores de angiogênese e moléculas pró-inflamação, as células endoteliais proliferariam, migrariam e formariam vasos, provendo o local com nutrientes e gerando uma potencial rota para metástase (Figura 7).

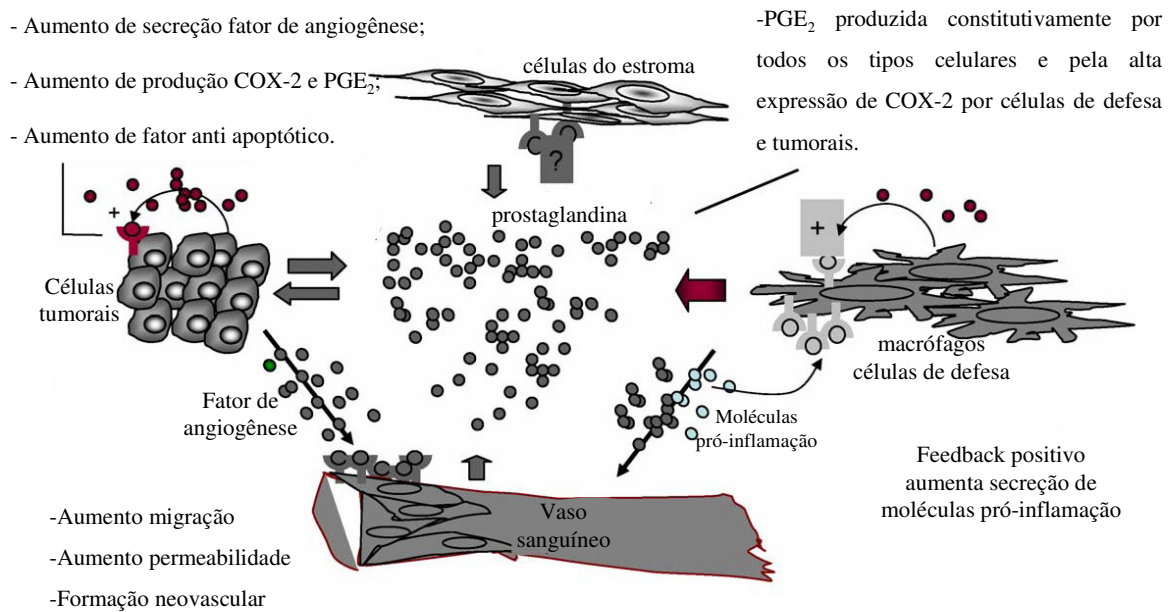


FIGURA 7 - ESQUEMA DO MODELO SOBRE A RELAÇÃO DA COX-2 COM A CARCINOGENESE.
 FONTE: Zha *et al.* (2004)

A enzima COX-2 é expressa constitutivamente em melanomas humanos e esta expressão parece estar envolvida na regulação da invasividade do melanoma (DENKERT *et al.*, 2001; KAKIUCHI *et al.*, 2002). De fato, a COX-2 tem sido descrita como um marcador tumoral para o melanoma, apresentando potencial de aplicação na terapêutica dirigida (NETTELBECK *et al.*, 2003; DUFF *et al.*, 2003).

Denkert *et al.* (2001) estudaram a expressão da enzima COX-2 e produção de PGE₂ em melanoma primário de pele, verrugas benignas, epitélio normal e de cinco linhagens de melanoma (A375, MEWO, SK-MEL-13, SK-MEL-18 e IGR-37). A expressão da COX-2 ocorreu em melanoma humano, mas foi ausente em verrugas benignas, assim como em epitélio normal. Uma expressão constitutiva de COX-2 (mRNA e proteína) e produção de PGE₂ foi observada em todas as linhagens de melanoma testadas e o tratamento das linhagens com NS-398, um inibidor específico de COX-2, inibiu a produção de PGE₂, porém não influenciou a proliferação.

Outra enzima que está relacionada com o aumento de PGE₂ e portanto, pode estar envolvida com a COX e o câncer é a enzima PGE₂ sintase (PGES), que

converte a PGH em PGE₂. Kamei *et al.* (2003) investigaram, através de estudos imunohistoquímicos de cancer de colon humano e ensaios com inibidor e oligonucleotídeo antisense em células de adenocarcinoma coloretal humano (HCA-7), que a expressão da isoforma mPGES-1 está relacionada a expressão da COX-2 e a diminuição da expressão desta isoforma causa diminuição da produção de PGE₂ e da proliferação celular. Os autores também demonstraram, através de análise de cDNA de células transfectadas simultaneamente com mPGES-1 e COX-2, mudanças na expressão de uma série de genes relacionados a proliferação, morfologia, adesão e ciclo celular, sugerindo que a expressão de mPGES-1 em combinação com COX-2 podem contribuir para a tumorigênese.

2.3 MELANOMA

Melanoma é uma neoplasia maligna, originada a partir de melanócitos, potencialmente letal com alta propensão a metástases. A sua etiologia é complexa e resulta de uma intrincada combinação entre a genética e exposições exógenas (RIGEL, *et al.*, 2000). O sol e a exposição à radiação ultravioleta são os maiores fatores de riscos ambientais para o desenvolvimento do melanoma (TUCKER e GOLDSTEIN, 2003). A susceptibilidade genética está, principalmente, associada a mutações em dois genes: CDKN2A, que codifica um inibidor de quinase dependente de ciclina (FOULKES *et al.*, 1997) e CDK4, que codifica a quinase dependente de ciclina 4. Ambos relacionados ao controle da divisão celular (HAYWARD, 2003). Mutações em outro gene, o MC1R, que codifica um receptor para hormônio estimulador de α -melanócito acoplado a proteína G, também está associado a risco de aparecimento de melanoma (HAYWARD, 2003).

O melanoma é um tumor com um agressivo potencial metastático, cujas opções de tratamento variam de acordo com a profundidade da lesão primária e

estágio de desenvolvimento. Em detecções precoces, a terapia principal é a excisão cirúrgica (RIGEL e CARUCCI, 2000). Quando em estágios avançados, representados pelo aparecimento de metástases, o prognóstico é bastante ruim, com sobrevida, dependendo do número e localização das metástases, variando em 4 a 6 meses. Nestes casos processos cirúrgicos raramente são curativos e a radioterapia é somente paliativa (AVRIL *et al.*, 2004). Modalidades terapêuticas não cirúrgicas, utilizadas em tratamentos de pacientes com melanomas metastáticos, incluem quimioterapia e terapias adjuvantes, como vacinas e citocinas (interferon e interleucina). Abordagens para o tratamento quimioterápico de melanoma são bastante decepcionantes. A Dacarbazina mantém-se como o único agente quimioterápico aprovado pela agência americana “Food and Drug Administration” – FDA, para o tratamento de melanoma metastático, sendo que não existe um agente quimioterápico que ofereça uma taxa de resposta maior que 25% quando utilizado sozinho e respostas de 9 a 55% são encontradas em tratamentos utilizando combinações de dacarbazina com outros compostos incluindo bleomicina, vincristina, cisplatina, vimplastina, nitrosoureas e tamoxifeno (EIGENTLER, *et al.*, 2003; RIGEL and CARUCCI, 2000). Os resultados encontrados para Dacarbazina, com taxas de respostas de 5,3 a 28,6%, variam bastante devido à heterogeneidade dos tratamentos, mas embora alguns tratamentos, especialmente poli-quimioterápicos, indiquem aumento da taxa de resposta, nenhum tratamento, mesmo em combinações com citocinas ou vacinas, tem sido capaz de prolongar a sobrevida em relação ao tratamento somente com dacarbazina (EIGENTLER, *et al.*, 2003). Em estudos clínicos com pacientes apresentando melanoma metastático, Avril *et al.* (2004), demonstraram, que o tratamento com fotemustina foi eficiente no aumento na taxa de resposta (13,4%) e período de sobrevida (7,3 meses) em relação a um grupo de pacientes tratados com dacarbazina (taxa de resposta de 6% e sobrevida de 5,6 meses), confirmando a fotemustina como um eficiente agente no tratamento contra melanoma. Porém estes resultados estão distantes de uma terapia ideal para a garantia de uma sobrevida prolongada aos indivíduos

acometidos por melanomas em estágios avançados, sendo necessária a continuidade de estudos na busca de novas drogas que possam apresentar um tratamento mais eficiente. Como o composto mesoiônico em estudo mostrou-se mais eficiente que as drogas Dacarbazina e Fotemustina em ensaios *in vivo*, realizados em camundongos inoculados com células de melanoma B16-F10, e não existem estudos dos efeitos do MI-D sobre a produção de PGE_2 e expressão da COX-1 e COX-2 em linhagens tumorais, avanços no entendimento da ação do MI-D neste aspecto, assim como início dos estudos pré-clínicos em relação à droga são de extrema importância.

2.4 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE

O tratamento sistêmico contra o câncer faz uso de drogas com diferenças tênues entre o efeito tóxico em células normais e seu efeito terapêutico letal para células malignas (SPARREBOOM e KARLSSOM, 2003). Sabe-se que a toxicidade é uma das maiores preocupações quando se trata de um agente com atividade antitumoral e, de fato, a estreita margem terapêutica desses compostos é incontestável. Muitas vezes a redução de um tumor ocorre em altas doses, que são próximas, ou iguais, à máxima dose tolerada. Em função dessa pequena diferença entre a dose necessária para um efeito antitumoral e aquela responsável por uma toxicidade inaceitável, é importante estabelecer uma dose ótima, na qual a possibilidade do efeito terapêutico é maximizada enquanto os riscos de toxicidade são minimizados.

As drogas que apresentaram efeitos positivos nos procedimentos iniciais de avaliação farmacológica e definição do perfil farmacológico devem ser cuidadosamente avaliadas quanto aos riscos potenciais antes de se iniciarem os testes clínicos (BERKOWITZ e KATZUNG, 1998).

A toxicidade de uma droga deve ser descrita de acordo com critérios como a severidade, a dose limite, toxicidade aguda e crônica, acumulação e via de administração (CHATELUT *et al.*, 2003). Para tanto, são descritos procedimentos, com algumas variações, adotados por diferentes países. No Brasil, os estudos de farmacologia clínica de novas drogas somente serão permitidos quando estiverem fundamentados em estudos pré-clínicos que demonstrem a atividade farmacológica da droga e indiquem claramente as características de sua toxicidade. Os testes pré-clínicos estão regulamentados pela resolução Nº 129/96 do Grupo Mercado Comum (MERCOSUL) que trata de Boas Práticas Clínicas (Brasil, 1996) e pela resolução Nº 251/97 do Conselho Nacional de Saúde que trata das Normas de Pesquisa com Novos Fármacos, Medicamentos, Vacinas e Testes Diagnósticos Envolvendo Seres Humanos (Brasil, 1997). Nestas Normas são exigidos estudos pré-clínicos em animais compreendendo análises de toxicidade aguda com obtenção do grau de letalidade e análises de toxicidade subagudas e crônicas.

Os estudos de toxicidade devem ser realizados pelo menos em três (toxicidade aguda) ou duas espécies (toxicidade subaguda com doses repetidas e crônica), das quais uma deverá ser de não roedores. Devem ser utilizadas pelo menos duas vias de administração, para os testes de toxicidade aguda, uma das quais deve estar relacionada com a via que se recomenda para o uso terapêutico proposto, e a outra deve assegurar a absorção do fármaco. Nos testes de toxicidade sub-aguda e crônica a via de administração deve estar relacionada com o emprego terapêutico proposto. (Brasil, 1996; Brasil, 1997).

Os testes de toxicidade subaguda a doses repetidas devem durar de 12 a 24 semanas e de toxicidade crônica devem apresentar duração de no mínimo 24 semanas de acordo com a natureza do produto, emprego terapêutico proposto e espécie animal a ser utilizada. Em ambos os testes, devem ser utilizadas um mínimo de três doses, sendo que a maior deve produzir efeitos tóxicos demonstráveis, e a menor relacionar-se com a dose terapêutica proposta, tendo em conta a sensibilidade da espécie utilizada (Brasil, 1996).

Os estudos devem analisar o aparecimento de efeitos tóxicos, relação dose - efeito e sua reversibilidade, diferenças relacionadas com o sexo e a espécie, morbidade e mortalidade, parâmetros bioquímicos, hematológicos e de nutrição (evolução do peso, consumo de água, etc), observações clínicas e anatomopatológicas, dose de efeito não tóxico, dose tóxica e órgãos brancos (não atingidos) (Brasil, 1996).

Estudos de toxicidade, envolvendo os compostos mesoiônicos são escassos. O composto 3-Piperonilsidnona (uma sidnona) não apresentou ação tóxica em doses de 500 mg/kg (NYBERG e CHENG, 1965). KIER e ROCHE (1967) discutem estudos da atividade biológica de compostos 1,3,4-tiadiazóis onde foram encontrados efeitos tóxicos, com determinação de DL_{50} em camundongos, excedendo a dose de 500 mg/kg e efeitos sobre o sistema cardiovascular com aumento da pressão arterial produzido por compostos com 5-*p*-clorofenil em cães. Particularmente, para o composto MI-D não foram detectadas alterações hematológicas em camundongos expostos a 15 mg/kg (GRYNBERG *et al.*, 1997). Entretanto, a atividade antitumoral foi observada em concentração superior a este valor (25 mg/kg). Desta forma, outros estudos de avaliação toxicológica do MI-D são necessários. Neste estudo foram realizadas análises para medida de DL_{50} em camundongos, análises histológicas de órgãos da cavidade peritoneal dos animais tratados e estudos de metabolização.

2.5 METABOLIZAÇÃO DE DROGAS PELO COMPLEXO CITOCROMO P450

Um aspecto importante a ser esclarecido sobre o perfil farmacológico de uma droga é a sua metabolização, em especial, o efeito sobre a atividade do complexo P450, determinando se a molécula é um substrato ou um inibidor dessas enzimas e

conseqüentemente, se é metabolizado ou influencia o metabolismo de outras drogas (BERKOWITZ e KATZUNG, 1998).

Os citocromos P450, possuem atividade de monooxigenases, ou de oxidases de função mista. A enzima citocromo P450 é uma hemoproteína, sendo assim nomeada pelo fato do complexo formado entre a sua forma reduzida e o monóxido de carbono apresentar um pico de absorbância no comprimento de onda 450 nm (OMURA e SATO, 1964). Apresenta dois importantes papéis como oxidase: o primeiro é a metabolização de xenobióticos, tendo um papel protetor, garantindo a degradação ou transformação destes compostos em moléculas mais polares e conseqüentemente facilitando sua excreção. O segundo está relacionado a metabolização de moléculas endógenas e biossíntese de moléculas sinalizadoras importantes no controle do desenvolvimento e homeostase. Em mamíferos a P450 atua no metabolismo de drogas e xenobióticos, assim como de eicosanóides, ácido retinóico e vitamina D3 e na síntese de colesterol e hormônios esteroides (OMURA, 1999).

Um grande número de isoformas de P450 pode ser encontrado em diferentes espécies. Atualmente existem 781 famílias de P450 descritas, sendo 110 famílias em animais, 95 em plantas, 205 em bactérias, 61 em protistas e 310 em fungos. São descritos 7.232 genes, sendo 2.565 em animais, 2.401 em plantas, 874 em bactérias, 210 em protistas e 1.182 em fungos (<http://drnelson.utmem.edu/p450stats.Feb2008.htm>). A classificação das inúmeras isoformas de P450 é determinada por critério filogenético através da similaridade na seqüência de aminoácidos. Proteínas que apresentam 40% ou maior identidade de seqüência são incluídas em uma mesma família e proteínas com identidade de seqüência maior que 55% são incluídas em uma mesma subfamília. A nomenclatura utilizada para denominar as isoformas de P450 determina que a raiz CYP seja seguida de um número arábico para indicar a família, uma letra para indicar a subfamília e um número para indicar um gene (COON *et al.*, 1992). Esta nomenclatura é recomendada e controlada pelo comitê de nomenclatura para P450

(<http://drnelson.utmem.edu/cytochromeP450.html>). Apesar do grande número de genes e enzimas, aparentemente somente as famílias CYP1, CYP2, and CYP3 têm um importante papel no metabolismo de drogas, sendo as representantes mais importantes CYP1A2, CYP2A6, CYP1B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 e CYP3A5 (FRYE, 2004).

Nos organismos eucarióticos, o citocromo P450 está localizado, principalmente ligado a membrana do retículo endoplasmático (GENTER *et al.*, 2006; NEVE e INGELMAN-SUNDBERG, 2000; RONIS *et al.*, 1991), porém pode ser encontrada, também, em mitocôndrias (GENTER *et al.*, 2006; NEVE e INGELMAN-SUNDBERG 2000; 1999), lisossomos (Ronis *et al.*, 1991), complexo de Golgi (NEVE *et al.*, 1996) e membrana plasmática (NEVE e INGELMAN-SUNDBERG 2000). Em algumas bactérias, o citocromo P450 encontra-se em uma forma solúvel (OMURA, 1999).

Em mamíferos, a distribuição do sistema P450 é ampla, podendo ser expressas múltiplas isoformas de forma simultânea em inúmeros órgãos (SELISKAR e ROZMAN, 2007), como fígado, intestino, pulmão, útero, bexiga urinária, pele, glândula adrenal, pâncreas (SAARIKOSKI *et al.*, 2005, MARTIGNONI *et al.*, 2006).

Em relação à forma de atuação do sistema, são encontrados inúmeros estudos descrevendo o ciclo da reação enzimática do complexo (COON, 2005; DENISOV, *et al.*, 2005; HODGSON e LEVI, 1994). As etapas principais deste ciclo, comuns a todas as descrições, são: 1) a enzima P450 oxidase (Fe^{3+}) combina-se com o substrato formando um complexo binário; 2) o cofator NADPH doa elétrons à enzima NADPH citocromo P450 redutase que reduz o complexo citocromo P450-substrato; 3) ocorre interação do complexo com um oxigênio molecular formando um complexo ternário, o complexo “oxigênio ativado” – citocromo P450 – substrato; 4) o complexo aceita um segundo elétron da enzima NADPH citocromo P450 redutase, resultando na formação de complexo intermediário peroxo-férrico que após protonado forma o intermediário hidroperoxo-férrico; 5) ocorre a adição de um segundo próton e transferência de um átomo de oxigênio para o substrato, formando

um produto oxidado. O segundo átomo de oxigênio é utilizado para formar uma molécula de água; 6) liberação do substrato oxigenado e retorno da enzima a condição inicial. O citocromo b5 participa de forma alternativa, na transferência de elétrons para o citocromo P450.

Outra possibilidade no desencadeamento das reações são a decomposição do complexo oxigenado em complexo citocromo oxidado-substrato e peróxido de hidrogênio ou ânion superóxido. Esta condição pode estar relacionada ao surgimento de manifestações da toxicidade do ânion superóxido, como a peroxidação de lipídeos (DENISOV *et al.*, 2005; HODGSON e LEVI, 1994).

Em geral, os substratos metabolizados pelo citocromo P450 são hidrofóbicos ou pouco solúveis em água, porém, pode ocorrer a metabolização de substâncias mais solúveis como álcoois, fenóis, detergentes e muitas outras moléculas orgânicas (DENISOV *et al.*, 2005). A especificidade de isoformas a xenobióticos é muito baixa, sendo a elevada lipossolubilidade, a única característica estrutural comum à grande variedade de fármacos e compostos químicos não relacionados estruturalmente que servem de substrato para este sistema (CORREIA, 1995). A diversidade de transformações químicas catalisadas pelo sistema demonstra a extrema versatilidade da enzima citocromo P450. São descritas reações de hidroxilação, N-oxidação, sulfoxidação, epoxidação, quebra oxidativa em grupos ester e amida, N-, S-, e O-desalquilação, peroxidação; *ipso*-substituição, desalogenação; dessulfuração, desaminação e redução de epóxidos, N-óxidos, grupos azo e grupos nitro (COON, 2005; RENDIC, 2002).

Modificações na composição do sistema P450 podem afetar o metabolismo *in vitro* e *in vivo* de drogas, tanto em modelos animais como em humano (GUENGERICH, 1988). Uma grande variedade de moléculas pode causar indução do sistema P450 através de estimulação de síntese protéica. Esta indução é seletiva e indutores específicos são utilizados para investigar a participação de diferentes isoformas da enzimas P450 no mecanismo de biotransformação de drogas (BRAUZE, 2004; KIKUTA, *et al.*, 2004; MINAMIYAMA *et al.*, 2004; NATSUHARA *et al.*, 2004;

WANG *et al.*, 2004; LI *et al.*, 1992). Em fígado de mamíferos, indutores como fenobarbital causam um aumento do retículo endoplasmático liso e indução de P450, aumentando de forma aproximadamente proporcional a concentração das diferentes isoenzimas P450 presentes (CZEKAJ, 2000; HODGSON e LEVI, 1994). A atividade enzimática do sistema oxidase, também pode ser inibida através de mecanismos variados, como inibição da síntese protéica e a competição com o substrato pelos sítios ativos das enzimas (WANG *et al.*, 1997). O composto mesoiônico 3-alquilsidnona foi identificado como inibidor irreversível da enzima monooxigenase citocromo P450 por destruição da enzima (GRAB *et al.*, 1988).

A investigação do metabolismo de drogas, incluindo o isolamento e caracterização de metabolitos, constitui uma parte integral no desenvolvimento da fase pré-clínica no estudo de novas drogas. As informações conseguidas destes estudos podem contribuir para a elucidação do mecanismo de ação e toxicidade de novos agentes terapêuticos (PATEL *et al.*, 1991). O metabolismo também representa um importante fator de variabilidade na resposta a drogas antitumorais. Neste contexto, é reconhecida a grande participação da superfamília citocromo P450 (MARRE *et al.*, 1996).

Não são conhecidos os citocromos P450 envolvidos na metabolização do MI-D, nem mesmo quais os produtos formados após esta metabolização.

3. JUSTIFICATIVA

O MI-D tem se mostrado uma droga promissora contra o melanoma, um tumor extremamente resistente à quimioterapia, o que motivou a solicitação de patente. Utilizando diferentes abordagens experimentais, vários estudos têm sido realizados no sentido de elucidar seu mecanismo de ação. Considerando o envolvimento de mitocôndrias nos mecanismos de morte celular, demonstrou-se que o composto apresenta efeito desacoplador; interfere na fluidez e na elasticidade da membrana mitocondrial, estes efeitos poderiam estar contribuindo para a ação antitumoral que foi verificada. Em células de melanoma humano o composto promoveu alteração na morfologia e organização dos filamentos de actina do citoesqueleto e redução da adesão à matriz extracelular. Sob outro enfoque, experimentos “in vivo” evidenciaram que o MI-D promove a diminuição dos níveis de PGE₂, sugerindo efeito inibitório sobre a ciclooxigenase 2, contudo ainda não são conhecidos os efeitos do MI-D sobre a COX em células de melanoma humano. Embora os estudos realizados até então tenham contribuído com valiosas informações no sentido de elucidar os possíveis mecanismos pelos quais o MI-D exerce sua ação antimelanoma, muito ainda resta para ser investigado. Também não são conhecidos parâmetros relacionados com a metabolização do composto em estudo e nem mesmo a DL₅₀. O presente estudo direcionou-se para obter dados relativos a estes aspectos ainda não esclarecidos, de forma particular sobre a relação existente entre os valores diminuídos de PGE₂ e a atividade antimelanoma do MI-D. Além disso, com o propósito de avançar, no sentido de uma futura aplicação clínica do composto, estudos pré-clínicos de metabolização e toxicidade foram também realizados.

4. OBJETIVOS

I) Verificar os efeitos do MI-D sobre os níveis de prostaglandina em células de melanoma murino e humano, bem como verificar a expressão da COX-2 nestas células. Contemplando os seguintes objetivos específicos:

- a- Realizar ensaios de viabilidade em células de melanoma murino (B16-F10) e melanoma humano (MEL-85, SK-MEL e MEWO), tratadas com MI-D;
- b- Investigar a produção de prostaglandina E_2 (PGE_2) em células de melanoma murino (B16-F10) e melanoma humano (MEL-85, SK-MEL e MEWO), assim como identificar a influência do MI-D nesta produção, estabelecendo relação com o efeito antitumoral do composto;
- c- Em células SK-MEL e B16-F10, identificar, através de “westernblotting”, a expressão de COX-1 e COX-2 e investigar a possível influência do MI-D nesta expressão estabelecendo relação com o efeito antitumoral do composto;

II) Avaliação em estudos pré-clínicos de metabolização e toxicidade do MI-D:

- a- Em camundongos tratados com MI-D, estabelecer a toxicidade aguda, determinando o índice de letalidade através estimativa da dose letal média – DL_{50} e análise histopatológica de órgãos da cavidade abdominal;
- b- Em fração microssomal hepática isolada de camundongo: investigar o mecanismo envolvido na metabolização do MI-D, usando como estratégia a identificação dos possíveis metabólitos através de separação e detecção em análise por HPLC e espectrometria de massas;
- c- Em fração microssomal hepática isolada de camundongo: investigar a metabolização do MI-D através de ensaios enzimáticos analisados por espectrofluorimetria e determinação de parâmetros cinéticos K_m e V_{max} .
- d- Em camundongo, investigar o mecanismo de metabolização *in vivo*, realizando identificação dos possíveis metabólitos no sangue e urina, através de separação e detecção em análise por HPLC.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATERIAIS

Os meios de cultura, meio essencial mínimo de Eagle - MEM e Meio RPMI 1640, assim como o soro fetal bovino inativado, foram adquiridos da Cultilab (Campinas Brasil). As linhagens celulares de melanoma foram obtidas do Instituto Ludwig de Pesquisa do Cancer (São Paulo, Brasil).

Os anticorpos primários anti-COX-1, anti-COX-2 e secundário anti-IGg de coelho conjugado a peroxidase foram adquiridos do fornecedor Santa Cruz Biotechnology, INC (California, USA). O anticorpo primário anti-actina, o kit de substrato quimioluminescente e os reagentes cristal violeta, azul de tripan, N, N, N', N' tetrametiletilenodiamine (TEMED), tripsina, fosfato de adenina dinucleotídeo forma reduzida (NADPH) fluoreto de fenil-metil sulfonila (PMSF) e mercaptoetanol, foram adquiridos da Sigma-Aldrich, INC (Saint Louis, USA). Os padrões de peso molecular foram fornecidos por GE Healthcare. O kit comercial "Prostaglandin E₂ EIA - Monoclonal" foi adquirido da empresa Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI). Os demais reagentes utilizados foram produtos comerciais, com alto grau de pureza.

O cloreto de 4-fenil-5-(4-nitrocinaoíl)-1,3,4-tiadiazolio-2-fenilamina (MI-D) foi sintetizado no Departamento de Química da UFRRJ e sua estrutura confirmada por ¹H-RMN, ¹³C-RMN e espectrometria de massa (DOS SANTOS e ECHEVARRIA *et al.*, 2001; GRYNBERG *et al.*, 1997).

5.2 ANIMAIS

Os animais utilizados para os testes de metabolização e toxicidade do MI-D foram camundongos *Mus musculus*, machos, pesando entre 20 e 30 g, provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (22 ± 3 °C), período claro/escuro de 12 h, e circulação de ar constante durante o período de aclimatação (7 dias), ensaios de toxicidade (14 dias), tratamento com fenobarbital para indução do sistema P450 (3 dias) e ensaios de metabolização *in vivo* (24 horas). Durante a permanência dos camundongos no laboratório, em sala apropriada, ocorreu o oferecimento constante de comida e água.

Todos os procedimentos envolvendo experimentação com animais propostos no presente projeto foram aprovados pela Comissão de Ética de Experimentação Animal (CEEa) do setor de Ciências Biológicas da UFPR sob protocolo número 108 (em anexo).

5.3 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE MI-D

Foram preparadas soluções de MI-D em diferentes concentrações em DMSO, para posterior diluição nos meios experimentais, de forma a garantir que a concentração final do veículo fosse constante, independentemente da concentração final do composto. A concentração do veículo (DMSO) variou em relação aos ensaios: 0,12% para os meios de tratamento para as células de melanoma em cultivo, 0,25% para o meio de reação de metabolização na fração microsomal e 50% para testes de DL₅₀. A solução de MI-D preparada para utilização em cultivo de células foi previamente esterilizada por filtração em unidade filtrante descartável,

com membrana fluoropore de poro 0,22 μm (Millipore®), em câmara de fluxo laminar. As soluções de MI-D foram conservadas em temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período máximo de 30 dias para garantia da manutenção das características do composto. Foi determinado o coeficiente de extinção molar do MI-D dissolvido em acetonitrila, obtendo-se o valor de 18.239, através de leitura de absorbância das concentrações de: 3,7; 7,3; 18,3 e 36,7 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em espectrofotômetro Hitachi modelo U-2001 UV/Vis, em comprimento de onda de 330 nm e aplicando-se a equação da reta com índice de correlação de 0,9975.

5.4 ENSAIOS COM CÉLULAS

5.4.1 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura, meio essencial mínimo de Eagle - MEM e Meio RPMI 1640, foram reconstituídos em água e esterilizados por filtração em membrana GS de éster de celulose com poros de 0,22 μm (Millipore®) sob pressão em aparelho Sartorius. Após a preparação e esterilização foram separadas alíquotas dos meios as quais foram mantidas em temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para o controle de possível contaminação. Os meios foram armazenados em temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou congelados em temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.4.2 SOLUÇÃO SALINA TAMPONADA (PBS)

Solução preparada 5x concentrada, constituída de NaCl 680 mmol.L⁻¹, KCl 13,4 mmol.L⁻¹, Na₂HPO₄ 40,5 mmol.L⁻¹, KH₂PO₄ 7,3 mmol.L⁻¹ sendo o pH ajustado para 7,4 utilizando HCl 1 mol.L⁻¹ ou KOH 1 mol.L⁻¹. Após preparo, a solução foi esterilizada em autoclave a 120°C, 1 atm por 30 min e armazenada a 4°C, sendo diluída em água estéril para o uso.

5.4.3 SOLUÇÃO DE BICARBONATO DE SÓDIO

Foi preparada solução de bicarbonato de sódio 1 mol.L⁻¹ em água e esterilizada em autoclave a 120 °C, 1 atm por 30 min e armazenada em temperatura ambiente.

5.4.4 TAMPÃO HEPES

Solução constituída de tampão HEPES 1 mol.L⁻¹, em água, com ajuste do pH para 7,4 com HCl 1 mol.L⁻¹ ou bicarbonato de sódio 1 mol.L⁻¹ foi esterilizada por filtração, em unidade filtrante descartável, em membrana com poro de 0,22 µm (Millipore®), em câmara de fluxo laminar e armazenada em temperatura de 4 °C ou congelada a temperatura de -20 °C.

5.4.5 SOLUÇÃO DE TRIPSINA-VERSENE

Solução constituída de NaCl 137 mmol.L⁻¹, KCl 5,4 mmol.L⁻¹, glucose 5 mmol.L⁻¹, Na₂HPO₄ 0,42 mmol.L⁻¹, KH₂PO₄ 0,44 mmol.L⁻¹, NaHCO₃ 2,3 mmol.L⁻¹, EDTA 0,53 mmol.L⁻¹, tripsina (1:250) 50 mg%, vermelho de fenol 2 mg%. O pH da solução foi ajustado para 7,4 utilizando bicarbonato de sódio ou ácido clorídrico 1 mol.L⁻¹. Quando necessário a solução foi esterilizada por filtração em membrana de GS de éster de celulose com poros de 0,22 µm (Millipore®) sob pressão em aparelho Sartorius e armazenada a – 20 °C.

5.4.6 SOLUÇÃO DE EDTA EM PBS

A solução de EDTA foi preparada na concentração de 10 mmol.L⁻¹ em PBS 5x concentrado. Posteriormente, foi esterilizada por filtração, em unidade filtrante descartável (membrana com poro de 0,22 µm (Millipore®), diluída até a concentração final de 2 mmol.L⁻¹, pH 7,4 e armazenada a temperatura de 4 °C.

5.4.7 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Toda a vidraria utilizada para a manutenção e ensaios foi esterilizada previamente, utilizando-se método de esterilização por autoclave, a temperatura de 120 °C, pressão de 1 atm por 30 min ou microondas em potência média por 45 min. As células e soluções foram manuseadas no interior de capela de fluxo laminar VECO, modelo VLFS-12, após esterilização por radiação UV por 30 min.

A linhagem murina B16-F10 e as linhagens de melanoma humano (MEWO, SK-MEL e MEL-85) foram cultivadas como descrito por Senff-Ribeiro *et al.* (2004a e b). Para tanto as células de melanoma foram cultivadas em monocamada, em garrafas estéreis, com meio de cultura acrescido de soro fetal bovino inativado (SFB), HEPES 20 mmol.L⁻¹, e bicarbonato de sódio 8 mmol.L⁻¹ para ajuste do pH para 7,4, e mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂, com umidade controlada de 95%. A linhagem B16-F10 foi cultivada em meio de cultura MEM contendo 7,5% de SFB. As linhagens de melanoma humano foram cultivadas em meio RPMI, sendo suplementado com 10% de SFB para as linhagens MEWO e MEL-85 e com 15% de SFB para a linhagem SK-MEL. Os repiques foram realizados utilizando solução de EDTA (2 mmol.L⁻¹) em PBS para descolamento das células de melanoma humano e Tripsina-Versene para a linhagem B16-F10. Para armazenamento, as células foram suspensas em meio de cultura contendo 40% de SFB (v/v) e 10% de DMSO (v/v), congeladas inicialmente a – 20 °C, seguindo a – 70 °C por 24 h e a seguir em nitrogênio líquido (-196 °C). Para uso as células foram colocadas a 4 °C até o descongelamento e posteriormente adicionadas em garrafas próprias para cultivo em meio de cultura contendo 30% de SFB e mantidas nas condições de cultivo. Após a adesão à garrafa, foi realizada troca do meio para retirada das células mortas e DMSO. A monocamada foi rotineiramente observada em microscópio invertido (Olympus, modelo CK2).

5.4.8 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

5.4.8.1 AZUL DE TRIPAN

As células foram plaqueadas em placas de 12 poços (2×10^5 células por poço) e mantidas por 24 a 48 h em estufa de CO_2 a 37°C para adesão e crescimento. O meio foi então substituído por outro contendo MI-D em concentrações de 2,5, 5, 10 e $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$, seguindo-se incubação por 1, 3 e 6 h. Experimentos também foram realizados com células não tratadas e tratadas com o veículo (0,12% de DMSO), nas mesmas condições. Para todos os ensaios, após o período de incubação, o meio foi retirado e centrifugado a 3.000 rpm por 4 min sendo descartado o sobrenadante e coletado o precipitado, que corresponde a células não aderidas. As células aderidas foram descoladas com $\text{EDTA } 2 \text{ mmol.L}^{-1}$ em PBS e as placas lavadas duas vezes com PBS, para que todas as células fossem coletadas. As células coletadas foram ressuspensas em PBS e centrifugadas novamente a 3.000 rpm por 4 min, sendo o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em PBS mantidas a 4°C até o momento da determinação da viabilidade celular (período inferior a 20 min). A taxa de viabilidade foi determinada pelo método de Azul de Tripán, o qual tem como princípio a exclusão do corante vital Azul de Tripán por células viáveis (Phillips, 1973). O corante foi preparado na concentração de 0,4% (p/v) em PBS, sendo adicionado à amostra em proporção de 1:10. As células foram contadas em câmara de Neubauer em microscópio óptico Olympus. A taxa de viabilidade foi calculada conforme a equação:

$$\text{Células Viáveis (\%)} = 100 \times \frac{\text{células não coradas}}{\text{células totais (não coradas + coradas)}}$$

A viabilidade dos controles foi normatizada para 100%.

5.4.8.2 CRISTAL VIOLETA

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, 5×10^4 células por poço, mantidas por 24 h em estufa de CO_2 a 37°C para adesão e crescimento. O meio foi, então, substituído por 200 μL de meio contendo MI-D em concentração de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, sendo realizada incubação por período de 2 h. Foram preparadas populações de células não tratadas (controle) e tratadas com o veículo (0,12% de DMSO) (controle veículo), nas mesmas condições de cultivo. Após o período de incubação, o meio foi retirado, as células foram fixadas com 200 μL de metanol por 10 min, coradas com 50 μL cristal violeta 0,2% em etanol 2% por 2 min, lavadas 10 vezes com PBS, rompidas com 200 μL de citrato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ em etanol 50% por 10 min e realizada homogeneização das amostras. Foi utilizado citrato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ em etanol 50% como branco para as determinações de absorbância em leitor de microplaca (Bio-Rad) utilizando filtro de 550 nm. O Cálculo da viabilidade proporcional foi determinado em relação à absorbância média dos controles tratados com o veículo (DMSO).

5.4.9 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Células de melanoma das linhagens murina B16-F10 e humana MEL-85 foram plaqueadas em placas de 12 poços contendo lamínulas estéreis, 2×10^5 células por poço e cultivadas por 24 h. As linhagens foram tratadas com MI-D $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em períodos de 1 e 3 h. Após o período de incubação, o meio foi retirado, as células lavadas com PBS, fixadas com Bouin (10% de formaldeído, 5% ácido acético e 75% de solução aquosa de ácido pícrico saturado) e coradas com Giemsa (MICHALANY,1980).

5.4.10 ENSAIO PARA DETECÇÃO DE DE PROSTAGLANDINA E₂

5.4.10.1 TRATAMENTO DAS CÉLULAS

As condições do ensaio foram baseadas em experimentos de Denkert *et al.* (2001). Células de melanoma humano das linhagens MEWO, MEL85 e SK-MEL e da linhagem murina B16-F10, foram plaqueadas em placas de 12 poços, em número de 2×10^5 células por poço e cultivadas por 24 h nas condições de cultivo descritas no item 5.2.7. Após este período, o meio foi substituído por meio de cultivo contendo $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MI-D e nos controles por meio apropriado contendo 0,12% de DMSO. As células foram incubadas em condições de cultivo por 2 h, sendo então o meio substituído por meio de cultivo sem MI-D e suplementado com ácido araquidônico $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$, seguindo-se incubação por 1 h. Ao final da incubação, o meio foi coletado e centrifugado a 5.000 rpm por 10 min, sendo o sobrenadante utilizado para detecção da concentração de prostaglandina através de kit comercial “Prostaglandin E₂ EIA - Monoclonal” Cayman Chemical Company, INC, como descrito a seguir. O mesmo protocolo foi utilizado para tratamento das células B16-F10 e MEL-85 com MI-D na dose de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

5.4.10.2 DETERMINAÇÃO DE PROSTAGLANDINA USANDO KIT “PROSTAGLANDIN E₂ EIA - MONOCLONAL”

Este ensaio é baseado na competição entre PGE₂ presente na amostra e PGE₂ conjugada a acetilcolinesterase (AchE) por uma limitada quantidade de anticorpo monoclonal anti-PGE₂ em placas de ensaio de Elisa. Devido a

concentração constante do conjugado $\text{PGE}_2\text{-AChE}$ presente no ensaio, a quantidade deste conjugado capaz de se ligar ao anticorpo é inversamente proporcional a concentração de PGE_2 presente no meio. O anticorpo anti- PGE_2 se complexa ao anticorpo policlonal anti-IgG que foi previamente aderido aos poços. Após a lavagem dos poços para a remoção dos reagentes não ligados, ocorre a adição do Reagente de Ellman's, o qual contém acetilcolina, substrato para a enzima acetilcolinesterase (AChE). O produto desta reação enzimática, a tiocolina, reage de forma não enzimática com o 5,5',ditio-bis-(2-ácido nitrobenzóico), produzindo o ácido 5-tio-2-ácido nitrobenzóico, que apresenta cor amarela e absorve fortemente em 412 nm. A intensidade da cor, determinada por espectrofotometria, é proporcional a quantidade de conjugado $\text{PGE}_2\text{-AChE}$ ligado ao poço, que por sua vez, é inversamente proporcional a concentração de PGE_2 da amostra presente no meio durante a incubação.

Para obter o valor de PGE_2 foi construída uma curva padrão com as seguintes concentrações de prostaglandina: 7,81; 15,63; 31,25; 62,50; 125; 250; 500 e 1000 pg/mL. Para as amostras coletadas a partir de células tratadas com MI-D e controles (DMSO) foram preparadas diluições de 10 e 30 vezes. Os procedimentos de determinação da concentração de prostaglandina foram realizados em duplicata para cada concentração da curva padrão e diluição das amostras. Cada amostra foi adicionada ao poço de determinação, juntamente com o conjugado $\text{PGE}_2\text{-AChE}$ e o anticorpo anti- PGE_2 em volumes iguais (50 μL). Poços utilizados para medidas de ligação inespecífica do conjugado $\text{PGE}_2\text{-AChE}$ (NSB) foram preparados contendo 50 μL do conjugado $\text{PGE}_2\text{-AChE}$ e 100 μL do tampão EIA. A capacidade máxima de ligação do conjugado (B_0) foi determinada em poços contendo tampão EIA, conjugado $\text{PGE}_2\text{-AChE}$ e anticorpo anti- PGE_2 em volumes iguais de 50 μL . A placa foi incubada por 18 h a 4 °C. Após o período de incubação, os reagentes foram retirados, os poços foram lavados 5 vezes com tampão de lavagem próprio do kit comercial, sendo adicionados 200 μL de Reagente de Ellman's em cada poço e 5 μL do conjugado $\text{PGE}_2\text{-AChE}$ no poço reservado para a determinação da atividade

enzimática total da AchE. O Reagente de Ellman's foi utilizado como branco para as determinações de absorbância em leitor de Elisa (Bio-Rad) utilizando filtro de 415 nm.

Os dados de absorbância foram transferidos para pasta de trabalho do Excel, sendo calculadas as concentrações a partir de curva padrão. Para tanto as absorbâncias médias NSB foram subtraídas das absorbâncias das amostras e de B_0 para a obtenção dos valores corretos. Posteriormente, foi determinado a proporção da ligação do conjugado PGE_2 -AchE das amostras (B) em relação a B_0 , isto é B/B_0 . Os valores de B/B_0 menores que 0,2 e maiores que 0,8 não foram considerados por estarem fora da faixa de linearidade da curva padrão.

Para o cálculo das concentrações, foi preparada curva padrão através de gráfico de B/B_0 versus concentração (pg/mL) em escala semi-log, sendo obtido equação da reta que permitiu o cálculo das concentrações. A concentração de prostaglandina produzida foi expressa em pg/mL por 2×10^5 células.

5.4.11 IMUNODETECÇÃO DE COX-1 E COX-2

5.4.11.1 TRATAMENTO DAS CÉLULAS SK-MEL E B16-F10

As células de melanoma humano da linhagem SK-MEL e melanoma murino da linhagem B16-F10 foram cultivadas em garrafas estéreis com área de cultivo de 75 cm^2 em número de 2×10^5 células e cultivadas até 90% de confluência nas condições de cultivo descritas no item 5.2.7. Após este período, o meio foi substituído por meio de cultivo contendo $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MI-D. Nas mesmas condições de cultivo foram preparadas culturas controle não tratadas e tratadas com

o veículo (0,12% de DMSO). As células foram incubadas em condições de cultivo por 2 h para posterior análise por eletroforese e imunodeteção da COX 1 e 2.

5.4.11.2 WESTERNBLOTTING

5.4.11.2.1 SOLUÇÕES

5.4.11.2.1.1 TAMPÃO DA AMOSTRA

Tampão Tris-HCl 67 mmol.L^{-1} , pH 6,8, contendo 11% de glicerol, 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$ de mercaptoetanol, preparado em água ultrapura e armazenado em alíquotas de $500 \mu\text{L}$ a temperatura de -20°C .

5.4.11.2.1.2 SOLUÇÃO DE POLIACRILAMIDA 30%

Esta solução foi preparada com 29,2% de acrilamida e 0,8 % de N',N' – Bis metileno acrilamida em água ultrapura, filtrada e armazenada em geladeira em frasco protegido da luz, por um período máximo de 30 dias.

5.4.11.2.1.3 GEL DE POLIACRILAMIDA 10% - GEL DE CORRIDA

O gel constituído de 10% de acrilamida, 1 mmol.L^{-1} de persulfato de sódio (APS) e $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ de N, N, N', N' tetrametiletilenodiamine (TEMED) em tampão Tris-HCl $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 8,8, contendo 0,2 % SDS, foi preparado no momento da montagem do sistema de eletroforese, a partir de soluções estoques de Tampão Tris-HCl $1,15 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 8,8, contendo SDS 0,4%; Acrilamida 30%; APS 10% e TEMED puro. Este gel foi acondicionado entre as placas de acrílico do sistema de eletroforese e mantido em temperatura ambiente até completa polimerização.

5.4.11.2.1.4 GEL DE ACRILAMIDA DE EMPILHAMENTO – “STACKING GEL”

Este gel foi preparado, no momento da montagem do sistema, a partir de soluções estoques de Tampão Tris-HCl $0,8 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo SDS 0,4%; Acrilamida 30%; APS 10% e TEMED puro, sendo sua constituição final: 3,75 % de acrilamida, $2,4 \text{ mmol.L}^{-1}$ de APS e $0,4 \text{ mmol.L}^{-1}$ de TEMED em tampão Tris-HCl $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,8, contendo 0,1% SDS. Para a corrida eletroforética o gel foi adicionado sobre o gel de poliacrilamida 10% (gel de corrida) e mantido em temperatura ambiente até completa polimerização.

5.4.11.2.1.5 TAMPÃO DE CORRIDA

Para a corrida da eletroforese, utilizou-se tampão Tris-HCl 20 mmol.L⁻¹, pH 8,3, contendo 1,4 mmol.L⁻¹ de SDS, preparado a partir de solução estoque 10 vezes concentrada.

5. 4.11.2.1.6 SOLUÇÃO DE TRANSFERÊNCIA

Esta solução, foi constituída de tampão Tris-HCl 25 mmol.L⁻¹ contendo 192 mmol.L⁻¹ de glicina, 1,2 mmol.L⁻¹ de SDS e 20% de metanol.

5. 4.11.2.1.7 TAMPÃO TRIS SALINO + TWEEN 20 (TBST)

Tampão para lavagem e bloqueio da membrana de nitrocelulose constituído de solução de Tris-HCl 20 mmol.L⁻¹, pH 7,4, contendo 120 mmol.L⁻¹ de NaCl e 0,5 mmol.L⁻¹ de tween 20.

5. 4.11.2.1.8 TAMPÃO TRIS SALINO + TWEEN 20 -LEITE (TBST-LEITE)

Solução constituída de tampão Tris salino + tween 20, contendo 5% de leite desnatado.

5.4.11.2.2 ELETROFORESE

O meio de cultura das células tratadas ou não com MI-D ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) ou com DMSO 0,12% (conforme descrito no item 5.4.1, foi retirado e em seguida as culturas foram lavadas com PBS e as células descoladas com o auxílio de rodo. As células coletadas foram, então, centrifugadas e os precipitados incubados com tampão da amostra por 30 min em temperatura ambiente. Posteriormente as células foram submetidas a ultrassom (3 ciclos de 20 s 20 W) e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

A eletroforese em condição desnaturante (SDS-PAGE) foi realizada com 100 μg de proteína em gel de acrilamida em sistema vertical, utilizando sistema do fabricante BioRad. Foi utilizado gel de empilhamento com acrilamida 3,7% com corrente de 15 mA e gel de corrida com poliacrilamida 10% com corrente de 20 mA, ambos em tampão de corrida. Foi adicionado azul de bromofenol em concentração de 0,005% na amostra para monitoramento da corrida eletroforética. Foram utilizados os seguintes padrões de peso molecular: fosforilase (PM = 97 kDa), albumina (PM = 66 kDa), ovoalbumina (PM = 45 kDa), anidrase carbônica (PM = 30 kDa), tripsina (PM = 20 kDa) e α lactoalbumina (PM = 10 kDa), fornecido por GE Healthcare, para a localização das bandas referentes a COX-1 (PM = 72 kDa) COX-2 (PM = 70 a 72 kDa) e actina (PM = 42 kDa).

5.4.11.2.3 TRANFERÊNCIA DAS PROTEÍNAS

As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando tampão de transferência em corrente de 100 V por 1 h. Para monitorar a qualidade de transferência e selecionar as regiões adequadas das bandas, as membranas foram coradas com Ponceau. As regiões correspondentes a COX (70 kDa) e actina (42 kDa) foram recortadas e utilizadas para a imunodeteção.

5.4.11.2.4 IMUNODETECÇÃO

As regiões selecionadas foram transferidas para recipientes adequados onde foram lavadas com TBST em sistema de agitação para descorar para serem bloqueadas por 1 h com TBST-leite em sistema de agitação para evitar ligações inespecíficas dos anticorpos nas membranas. Posteriormente, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos (COX-1 e COX-2: diluição de 1:100 e actina: diluição de 1:200) em período de 16 h a 4 °C. As membranas foram lavadas com TBST-leite com agitação (5x por 5 min), incubadas por 1 h com anticorpo anti IgG de coelho conjugado com peroxidase, em temperatura ambiente com agitação. Posteriormente foram lavadas com TBST em sistema de agitação (5x por 5 min) e realizada revelação através de formação de produto quimioluminescente por adição de substrato quimioluminescente para peroxidase segundo instruções do fabricante. A luminescência foi captada em câmara escura por câmera CCD, em sistema acoplado vídeo-imagem (UVP) e as imagens foram analisadas utilizando software de análise de imagem Imagequant TL 7.0, desenvolvido por GE Healthcare. Os níveis de expressão foram analisados através das intensidades das bandas (COX-1 ou

COX-2) em relação a intensidade das respectivas bandas de actina, comparando-se com as amostras controles.

5.5 ENSAIOS DE METABOLIZAÇÃO DO MI-D

5.5.1 INDUÇÃO DO SISTEMA P450

Os ensaios de metabolização do MI-D foram realizados com microssomas hepáticos de camundongos *Mus musculus*, machos, após indução de expressão de enzimas do sistema P450 por tratamento com fenobarbital. Para esse propósito, foram utilizados 09 animais com peso entre 30 e 45 g. Os animais foram induzidos através de injeção peritoneal de 80 mg/Kg de peso corpóreo de fenobarbital dissolvido em PBS, diariamente, por um período de 3 dias. Após este período os animais foram eutanasiados por ruptura da medula espinhal e realizada coleta do fígado com posterior isolamento da fração microssomal.

5.5.2 ISOLAMENTO DA FRAÇÃO MICROSSOMAL

O isolamento da fração microssomal de fígado de camundongos, foi realizado segundo Acco (2003) e Bracht *et al.* (2003), utilizando como meio de isolamento Tampão Tris-HCl 20 mmol.L⁻¹ pH 7,4, KCl 150 mmol.L⁻¹ e fluoreto de fenil-metil sulfonila (PMSF) 100 µmol. L⁻¹. As amostras foram mantidas a temperatura de 4 °C durante os procedimentos realizados.

Após jejum de 12 h, os camundongos foram eutanaziados por decapitação, o fígado foi extraído e transferido para placa de Petri contendo meio de isolamento. O fígado foi cortado em pequenos pedaços, lavado com tampão de isolamento e homogeneizado em homogeneizador de Van Potter Elvehjen por cinco vezes (3 vezes com pistilo frouxo e 2 com o pistilo apertado). O homogeneizado obtido foi centrifugado em centrífuga refrigerada Hitachi modelo CR21E, em velocidades crescentes de 2.550, 7.080 e 12.434 x g por 10 min, sendo descartado o sedimento a cada centrifugação. Posteriormente, o sobrenadante da última centrifugação foi centrifugado em ultracentrífuga refrigerada Hitachi modelo CP90β a velocidade de 105.000 x g por 1 h. O sobrenadante foi descartado e o sedimento, constituído da fração microssomal, ressuspenso em 500 µL de meio de isolamento.

A determinação da concentração de proteína da fração microssomal foi realizada pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se soroalbumina bovina como padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Hitachi modelo U-2001 UV/Vis em comprimento de onda de 700 nm. A fração microssomal de cada animal foi obtida separadamente, sendo congelada em nitrogênio líquido até o momento do uso.

5.5.3 EXTRAÇÃO E DETECÇÃO DO MI-D E DE POSSÍVEIS PRODUTOS DE METABOLIZAÇÃO

5.5.3.1 METABOLIZAÇÃO “IN VITRO” DO MI-D

O sistema de incubação utilizado foi preparado segundo descrito por Acco (2003). O MI-D, em concentração de 25 µmol.L⁻¹ foi incubado em meio contendo MgCl₂ 6 mmol.L⁻¹, tampão fosfato 20 mmol.L⁻¹, pH 7,4, NADPH 1 mmol.L⁻¹ e 1 mg de

proteína microsomal por mL, em volume final de 1,2 mL. As incubações foram realizadas no escuro, devido à sensibilidade do MI-D a luz, em tempos variando de 2,5; 5 a 10 min de reação em banho DUBNOFF modelo 144, com agitação constante a temperatura de 37 °C. Foram preparadas as seguintes amostras controles: 1) DMSO em sistema de incubação sem MI-D, 2) sistema sem incubação e 3) DMSO em sistema de incubação sem MI-D por 5 min a 37 °C. Após o período determinado da reação com a fração microsomal, alíquotas de 1,2 mL foram adicionadas a 5 mL de clorofórmio contidos em funis de separação, seguindo-se a agitação por 1 min e repouso por 40 min. Posteriormente, a fase orgânica foi separada e o procedimento de extração repetido duas vezes. As alíquotas das fases orgânicas das três extrações foram misturadas, o clorofórmio foi evaporado em rota evaporador e o resíduo foi dissolvido em 500 µL de Acetonitrila e analisado por HPLC. Alternativamente, as amostras foram preparadas segundo procedimentos de Bogaards *et al.*, (2000), como segue: após o período determinado da reação, alíquotas de 1,2 mL foram adicionadas à 300 µL de acetonitrila a 4°C, agitadas em vortex, centrifugadas em microcentrífuga (Sanyo MSE microcentaur) a 13.000 rpm por 20 min e o sobrenadante foi coletado e analisado diretamente por HPLC. Todos os procedimentos foram realizados no escuro.

5.5.3.1.1 ANÁLISE POR HPLC

Para as análises cromatográficas foi utilizado cromatógrafo líquido de alta Performance Shimadzu, equipado com uma bomba LC-10AD, detector de ultravioleta-visível SPD-10A, Forno CTO-10A e injetor CBM-10A. A coluna utilizada foi Hypersil C18 250 x 4,6 mm com partículas de sílica de 10 µm, Metachem. A detecção foi realizada em comprimento de onda de 330 nm.

Foi utilizada fase móvel composta de 5 mmol.L⁻¹ de ácido acético glacial pH 4,6 em sistema de gradiente de acetonitrila, com início em 50% de acetonitrila, atingindo 90% de acetonitrila em 15 min, permanência nesta condição por 15 minutos e retornando para acetonitrila 50% nos próximos 15 min. Foi utilizado loop de 50 µL e injetado 100 µL de amostra, em um fluxo de 1 mL.min⁻¹. Foi utilizado padrão de MI-D dissolvido em DMSO e posteriormente em acetonitrila para comparação com os cromatogramas resultantes da reação de metabolização.

5.5.3.1.2 OBTENÇÃO DE ESPECTRO DO MI-D E POSSÍVEL METABÓLITO

Os espectros do MI-D e possíveis metabólitos foram obtidos a partir da varredura espectrométrica de comprimentos de onda durante a corrida cromatográfica, através de utilização de arranjo fotoelétrico de diodo (PDA). As regiões dos picos do MI-D e possível metabólito foram selecionadas sendo comparados os seus comportamentos espectrométricos na faixa de comprimento de onda entre 200 e 750 nm.

5.5.3.1.3 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

A fração coletada do produto do MI-D foi analisada em espectrômetro de massas (Quatro II, Micromass) no modo positivo - ESI⁺/MS⁻, com as seguintes especificações: fluxo de 15 µL/min, temperatura da fonte de 100 °C, potencial do cone em 30 V. Para a análise MS/MS, foi usada pressão de 1,2x10⁻³ mBar em célula de gás e energia de colisão de 20 eV no interior de câmara de colisão.

5.5.3.1.4 ANÁLISE POR ESPECTROFLUORIMETRIA

5.5.3.1.4.1 METABOLIZAÇÃO DO MI-D PELO SISTEMA P450

Foram realizadas preparações com frações microsossomais em presença de marcadores da atividade de enzimas do sistema P450, benziloxiresorufina, substrato preferencial para as isoformas da família 2B do citocromo P450 (CYP2B) e etoxiresorufina, substrato preferencial das isoformas da família 1A do sistema P450 (CYP1A), além do composto em análise, MI-D. Estes ensaios foram delineados para a identificação da possível influência do MI-D na metabolização dos marcadores. O meio de reação composto de 300 $\mu\text{g/mL}$ de proteína microsossomal em tampão fosfato 0,1 mol.L^{-1} , pH 7,4, foi acrescido de 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de MI-D e um dos marcadores etoxiresorufina ou benziloxiresorufina (5 mmol.L^{-1}), solubilizados em DMSO (concentração de DMSO no meio foi de 0,3%) e após 1 min de equilíbrio a reação foi iniciada com a adição de 170 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de NADPH. O volume final da incubação foi de 3 mL. O sistema de incubação utilizado foi preparado segundo descrito por Burke *et al*, (1985). A reação ocorreu a temperatura 37 °C, sob agitação, em espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC, acoplado a computador. As alterações dos sinais de fluorescência, devido a acúmulo de produto fluorescente, foram monitoradas nos comprimentos de onda de 530 nm e 585 nm para excitação e emissão, respectivamente e, abertura da fenda de 5 nm. Tempo total de monitoramento 2 min de reação. Foram preparados os seguintes controles: 1) sistema de metabolização com os marcadores e sem o MI-D; 2) sistema de metabolização com o MI-D mas sem os marcadores; 3) sistema de metabolização sem substrato (marcador ou MI-D); 4) sistema de metabolização com o MI-D mas sem NADPH.

5.5.3.1.4.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS – Km e Vmax

Frações microsossomais isoladas de três animais, separadamente, foram incubadas em presença de MI-D em diferentes concentrações. O meio de reação constituído de 100 μg de proteína microsossomal em tampão fosfato 0,1 mol.L^{-1} , pH 7,4, foi acrescido de MI-D (2,5, 5, 7,5, 10, 15, 25, 30 e 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), em DMSO 0,25 %) e após 1 min de equilíbrio a reação foi iniciada com a adição de 170 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de NADPH. O volume final da reação foi de 3 mL. A reação ocorreu à temperatura 37 °C, sob agitação, em espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC, acoplado a um computador. As alterações dos sinais de fluorescência, devido ao acúmulo de produto fluorescente resultante da metabolização do MI-D, foram monitoradas nos comprimentos de onda de 530 nm e 585 nm para excitação e emissão, respectivamente, e abertura da fenda de 5 nm. Os dados de fluorescência, monitorados por 50 segundos, foram utilizados para o cálculo dos parâmetros cinéticos de velocidade inicial, Km e Vmax. Através da plotagem dos dados de fluorescência em função do tempo, em gráfico linear, foi calculada a velocidade inicial da reação (V_0). Por sua vez, os valores de V_0 plotados em função da concentração de MI-D em gráfico duplo-recíproco (Lineweaver-Burk), possibilitaram o cálculo de Km ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) e Vmax (unidades de fluorescência por segundo).

5.5.3.2 METABOLIZAÇÃO “IN VIVO” DO MI-D

Para as análises de metabolismo *in vivo*, foram preparados seis grupos de três camundongos induzidos com fenobarbital (injeções de 80 mg/kg de fenobarbital em PBS diariamente por três dias), pesando de 25 a 30 g e identificados como: MI-D 1 h; MI-D 2 h; MI-D 3 h; controle DMSO 1, 2 e 3 h. Os animais dos grupos

experimentais foram tratados com MI-D 50 mg/kg dissolvido em DMSO/PBS 50% através de injeção intraperitoneal de 200 μ L da solução. Os animais dos grupos controles DMSO foram tratados com o mesmo volume do veículo. Após o período de 1, 2 e 3 horas, os animais foram anestesiados com éter e realizada coleta de sangue por punção cardíaca e urina por punção da bexiga urinária. Posteriormente os animais foram eutanaziados com éter. Foram coletadas amostras de aproximadamente 1 mL sangue, com heparina para a separação do plasma através de centrifugação a 3.000 rpm por 3 minutos. Ao plasma coletado foi adicionado 40% do volume de acetonitrila, realizada nova centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi analisado por HPLC através de injeção de 50 μ L. Nos mesmos períodos de teste foram coletadas amostras de aproximadamente 500 μ L de urina, centrifugadas por 15 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante foi analisado por HPLC através de injeção de 50 μ L da amostra. As condições de análise por HPLC foram as mesmas descritas para a análise de metabolização *in vitro*, descritas no item 5.5.3.1.1.

5.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE “IN VIVO”

5.6.1 ENSAIO DE TOXICIDADE - DETERMINAÇÃO DA DL₅₀

Para a determinação da DL₅₀ foram preparados 9 grupos contendo de 6 a 11 camundongos, pesando entre 20 e 25 g, tratados com MI-D em DMSO/PBS 50%, sendo 7 grupos experimentais, nas doses: 50, 100, 200, 250, 300, 400, 500 mg (MI-D)/Kg do animal e dois grupos controles DMSO/PBS 50% e PBS. Após a administração intraperitoneal de 100 μ L da droga, os animais foram colocados sobre bancada para deambulação livre e observados por 1 h, quanto a alterações

comportamentais e morte. Novas observações foram realizadas depois de 6 h, 24 h e diariamente por 14 dias após a administração do composto. Diariamente foi anotado o número de mortes. No décimo quarto dia os animais foram eutanasiados com éter e realizada coleta de amostras de fígado, rim e pâncreas para análises de alterações histológicas. A determinação da DL_{50} foi realizada utilizando-se o método de Litchfield & Wilcoxon, (1948), para grupos com número diferentes de indivíduos.

5.6.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os procedimentos de processamento histológico foram realizados segundo Michalany (1980). Os órgãos foram coletados, lavados em solução salina e fixados em solução contendo 65% de álcool, 8% de formaldeído e 5% de ácido acético, por 24 h e posteriormente, armazenados em álcool 70% até o processamento histológico de rotina. O processamento histológico foi realizado através de desidratação em série alcoólica crescente de etanol passando por álcool 80%, 85%, 90%, 95% e etanol absoluto. Posteriormente, foi realizada diafanização em xilol e impregnação e inclusão em parafina a 56 °C. Os blocos foram cortados em micrótomo à espessura de 5 μ m e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina para análise morfológica. As lâminas foram fotografadas em microscópio Olympus acoplado a sistema fotográfico, em aumentos de 40, 100, 200 e 400 vezes.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de ensaios de viabilidade e Westernblotting foram analisados utilizando-se teste de χ^2 e teste de Mann-Whitney. Para os ensaios de produção de

prostaglandina foi utilizado teste-t e para a análise de variância de Km e Vmax foi realizada comparação dos parâmetros a e b, das equações das retas originadas dos gráficos duplo-recíproco, por teste Anova. Todos os testes foram realizados através do software *Estatística para microcomputadores XL Stat 2008*. Para determinar diferenças entre os grupos foi considerado nível mínimo de significância $p < 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ENSAIOS COM CÉLULAS DE LINHAGENS DE MELANOMA

6.1.1 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

A influência do MI-D sobre a viabilidade de células de melanoma foi testada em células de melanoma murino, linhagem B16-F10 e células de melanoma humano - linhagens MEL-85, MEWO e SK-MEL -, nas doses de 2,5; 5; 10 e 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em períodos de tratamento de 1, 3 e 6 h, sendo avaliada através do método que utiliza, como o princípio, a exclusão do corante vital Azul de Tripan por células viáveis (PHILLIPS, 1973). Estes ensaios foram realizados com o objetivo de selecionar a dose e tempo de incubação a serem utilizados nos testes de influência do MI-D na produção de prostaglandina por células de melanoma, sendo considerados ideais a maior dose e tempo de incubação que não causasse alteração na viabilidade celular.

As células de melanoma murino (B16-F10) não apresentaram alteração de viabilidade nas doses de 2,5 e 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ nos períodos de tratamento testados (Figura 6). Entretanto, para as concentrações de 10 e 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, após 3 e 6 horas de incubação observou-se uma significativa diminuição da viabilidade. No tempo de três horas, a concentração de 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ promoveu a redução de 10% na viabilidade, passando para 20% após 6 h de tratamento. Para a maior concentração (25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) foi observada redução de 20 % e 70% da viabilidade em 3 h e 6h de tratamento, respectivamente (Figura 8).

As alterações na viabilidade foram acompanhadas de alterações da morfologia celular. Na concentração de 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de MI-D as células

apresentaram-se com diminuição do tamanho celular e aparente perda de sua capacidade de aderência à placa, após 1 e 3 h de tratamento (Figura 9). Estes resultados foram similares aos descritos por Senff-Ribeiro *et al.* (2003; 2004a), utilizando medida de viabilidade através de Azul de Tripán em células B16-F10 submetidas a concentrações de 2,5; 5; 10; 25; 50 e 75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de MI-D, em 1, 3, 24, 48 e 72 horas de tratamento. Os autores não observaram efeitos citotóxicos para as concentrações de 2,5 e 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, porém, identificaram redução da viabilidade em função do tempo de tratamento, para as concentrações de 10 e 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de MI-D após 3 horas de tratamento em ~10% e ~30%, respectivamente. Os autores não realizaram testes no período de 6 horas de tratamento.

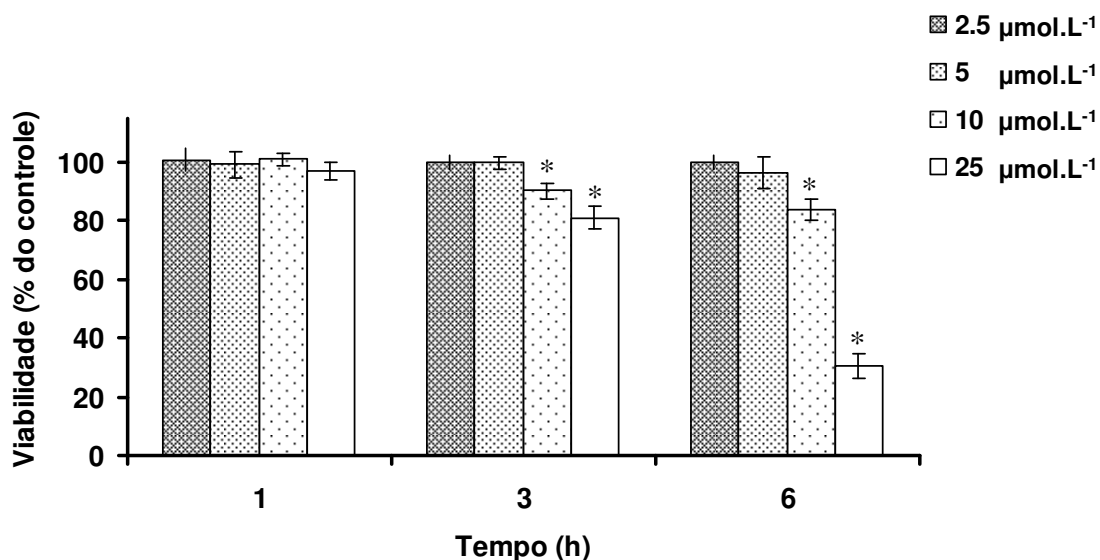


FIGURA 8 - EFEITO DO MI-D SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS B16-F10

FONTE: O autor (2008)

NOTA: Células B16-F10 foram plaqueadas em placas de 12 poços, 2×10^5 células por poço. Cultivadas por 24 h em estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO_2 , com umidade controlada de 95% e tratadas com MI-D, nas concentrações indicadas em períodos de 1, 3 e 6 h. As células soltas no meio e aderidas à placa foram coletadas após descolamento com tripsina Versene e a viabilidade foi medida através de ensaio de exclusão do corante azul de tripan conforme item 5.4.8.1 da seção de materiais e métodos. As barras mostram média \pm DP. * $p < 0,05$.

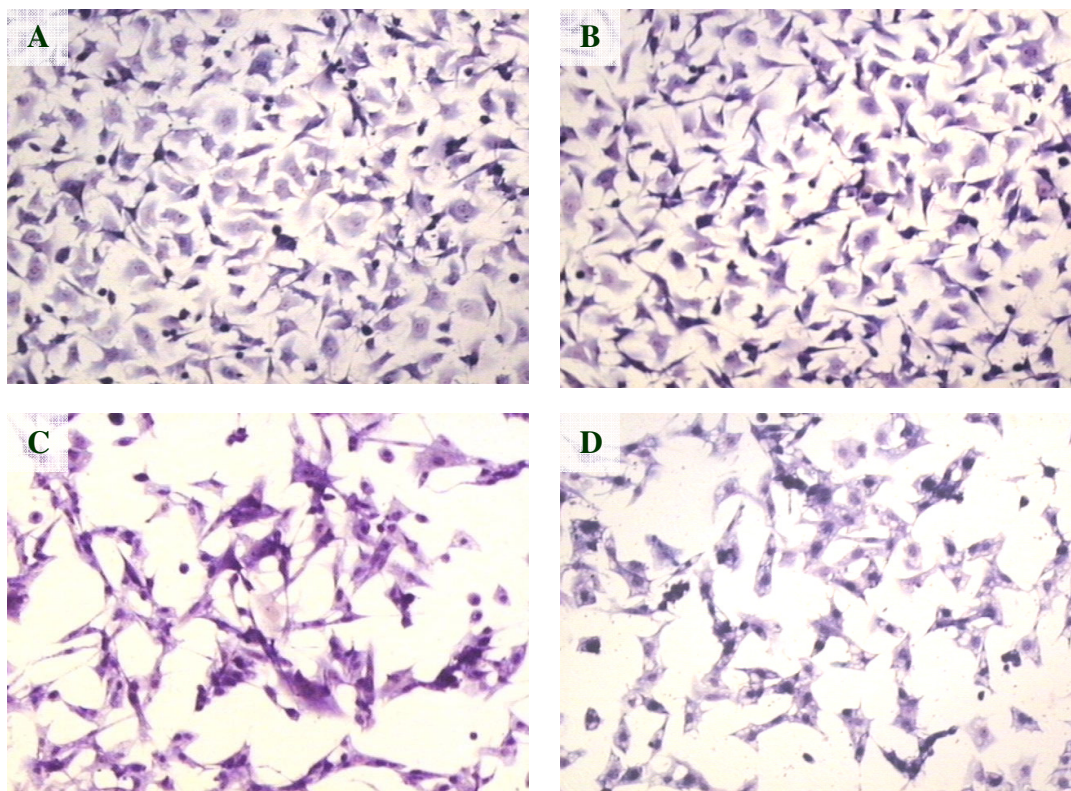


FIGURA 9 - MORFOLOGIA DE CÉLULAS B16-F10 TRATADAS COM MI-D

FONTE: O autor (2008)

NOTA: Células B16-F10 foram plaqueadas em placas de 12 poços contendo lamínulas estéreis, 2×10^5 células por poço. Cultivadas por 24 h em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 , com umidade controlada de 95% e tratadas com MI-D $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em períodos de 1 e 3 h. Após o período de incubação, o meio foi retirado, as células lavadas com PBS, fixadas com Bouin e coradas com Giemsa conforme item 5.4.9 da seção de materiais e métodos. A) controle, B) controle veículo (DMSO 0,12%), C) após 1 h de tratamento, D) após 3 h de tratamento. Aumento: 100x.

Para as linhagens de melanoma humano, não foram observados efeitos significativos do MI-D sobre a viabilidade nas concentrações e tempos de tratamento testados (Figuras 10). Entretanto, para a linhagem MEL-85, observaram-se alterações morfológicas apresentando diminuição do volume celular e formação de vacúolos no citoplasma, além de aparente perda de aderência celular à placa nas concentrações de 10 e $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$, após 3 h de tratamento (Figura 11).

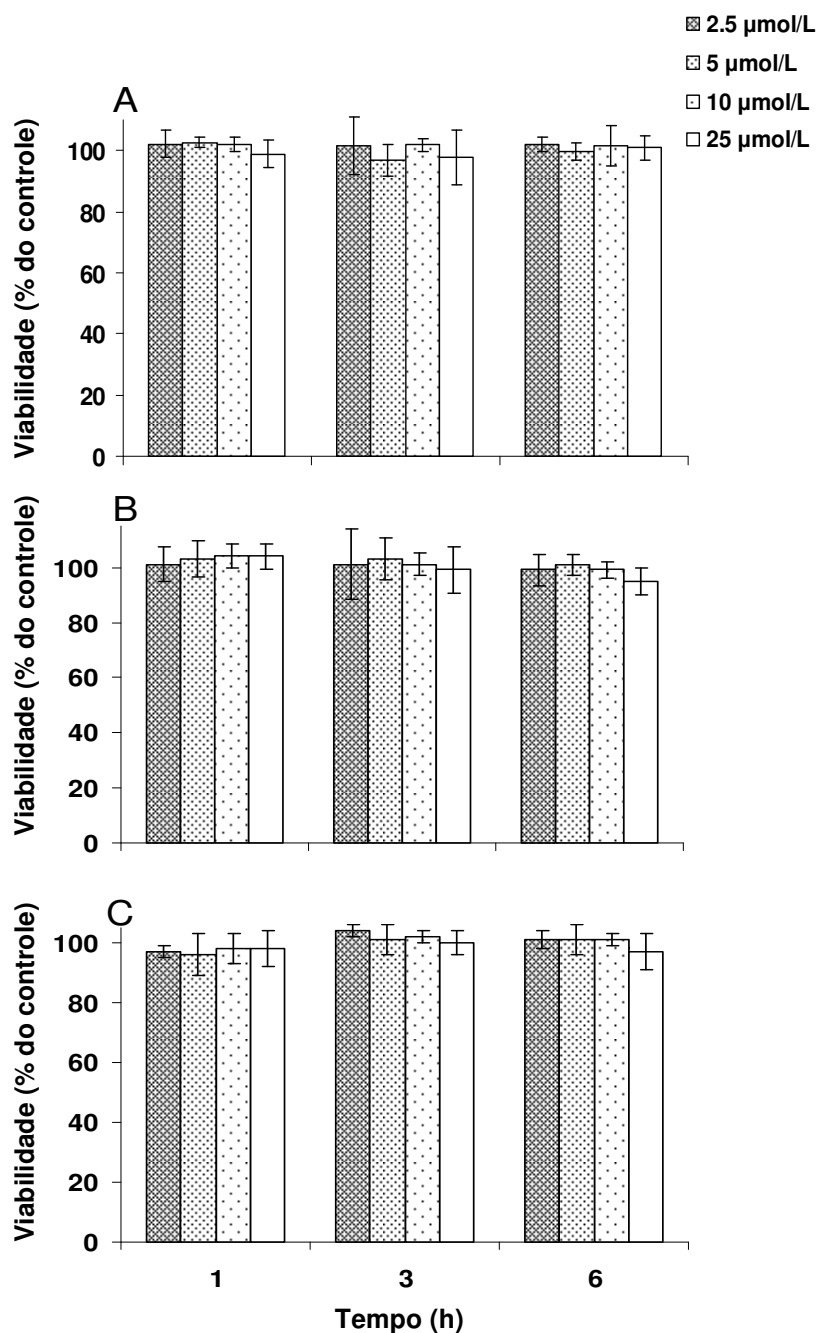


FIGURA 10 - EFEITO DO MI-D SOBRE A VIABILIDADE DE LINHAGENS DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO

FONTE: O autor (2008)

NOTA: Células MEL-85 (A); SK-MEL (B); MEWO (C), foram plaqueadas em placas de 12 poços, 2×10^5 células por poço. Cultivadas por 24 h em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 , com umidade controlada de 95% e tratadas com MI-D em períodos de 1, 3 e 6 h. As células soltas no meio e aderidas na placa foram coletadas após descolamento com EDTA 2 mmol.L^{-1} em PBS e a viabilidade foi medida através de ensaio de exclusão do corante azul de tripan. As barras mostram média \pm DP.

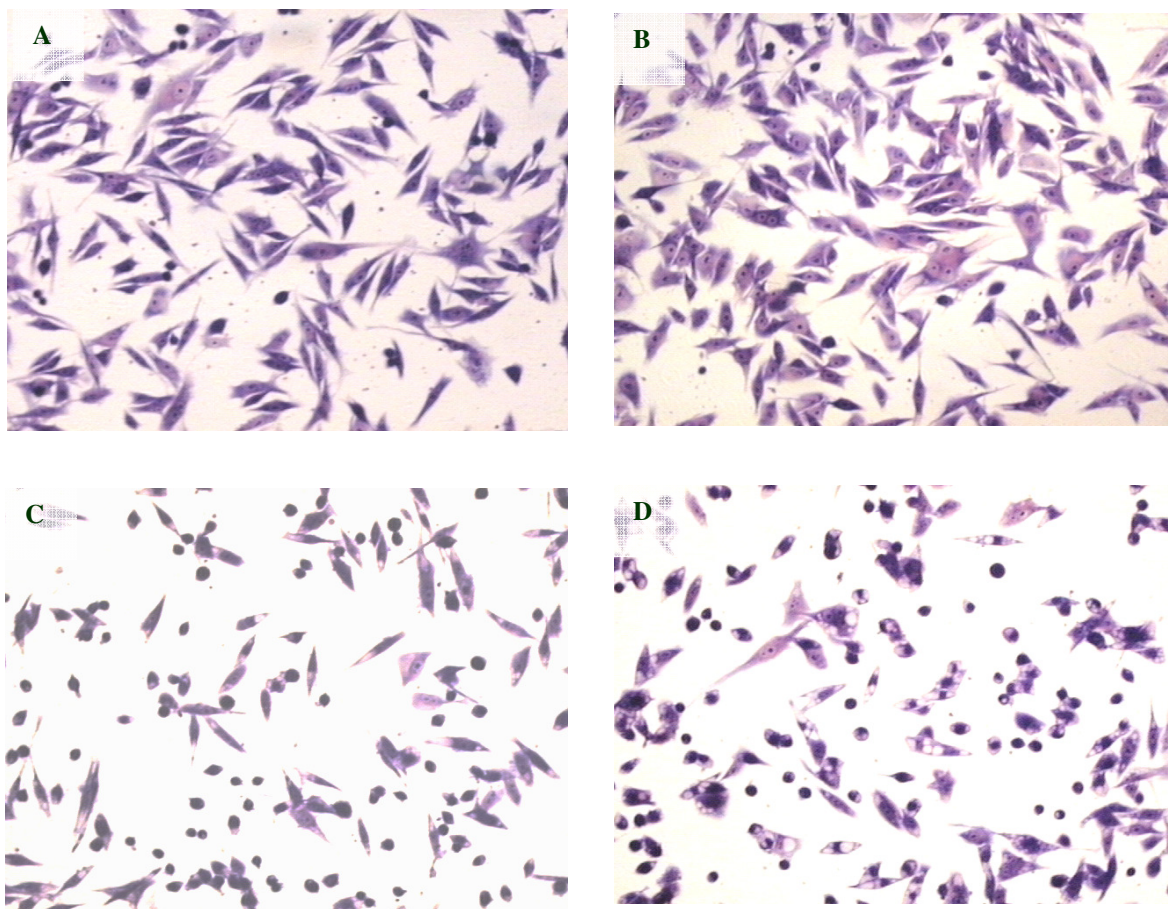


FIGURA 11 - MORFOLOGIA DE CÉLULAS MEL-85 TRATADAS COM MI-D

FONTE: O autor (2008)

NOTA: Células MEL-85 foram plaqueadas em placas de 12 poços contendo lamínulas estéreis, 2×10^5 células por poço. Cultivadas por 24 h em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 , com umidade controlada de 95% e tratadas com MI-D 10 e $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em período de 3 h. Após o período de incubação, o meio foi retirado, as células lavadas com PBS, fixadas com Bouin e coradas com Giemsa. A) controle não tratado, B) controle veículo (DMSO 0,12%), C) $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, D) $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Aumento: 100x

Senff-Ribeiro *et al.* (2004b) demonstraram que o MI-D reduz a viabilidade das três linhagens celulares aqui utilizadas, quando as células foram submetidas a concentração superior a $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, porém em tempo de tratamento de 24 horas. Os mesmos autores também descreveram, para a linhagem MEL-85, que o MI-D promove alterações na morfologia e perda de adesão celular. Naquele estudo, células tratadas com MI-D, em concentrações de 2,5 e $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ por 2 h apresentaram significativa inibição da adesão a matriz extracelular. A adesão à

laminina e fibronectina foi inibida em concentração de $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e a inibição de adesão ao matrigel ocorreu em concentração de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

As alterações da morfologia celular, reconhecida como redução do volume celular e tendência a forma esférica foram atribuídas à desorganização dos filamentos de actina, observados após tratamento das células com concentrações de 25 e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MI-D por 2 horas. Portanto, embora neste estudo, o MI-D não tenha afetado a viabilidade das células de melanoma humano, as alterações morfológicas observadas estão de acordo com os resultados previamente descritos por Senff-Ribeiro *et al.* (2004b).

Considerando os resultados de viabilidade celular e análise morfológica das células de melanoma murino e humanas e, também, tomando-se em conta os resultados descritos por Senff-Ribeiro *et al.* (2003, 2004a, 2004b) foram descartados os tempos (3 e 6 horas) e a concentração de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ como opção para os ensaios de produção de PGE_2 , devido as alterações morfológicas e de viabilidade observadas nestas condições. Optou-se então pela concentração de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MI-D e tempo de 2 horas para os experimentos subseqüentes de produção de PGE_2 .

No entanto, devido às alterações de morfologia e adesão observadas para as células B16-F10 e MEL-85 fez-se necessária a realização de outro ensaio de viabilidade, utilizando o método de cristal violeta. Este método tem como princípio a detecção colorimétrica para identificação de alteração no número de células aderidas (consideradas viáveis), o que evitaria que células soltas pudessem figurar como células viáveis - uma vez que o método de Azul de Tripán não distingue estas células -. Esta diferença é importante, pois no ensaio de quantificação de PGE_2 , o sobrenadante é descartado e a produção de PGE_2 induzida pela adição de ácido araquidônico é feita com as células que permanecem aderidas.

O ensaio de cristal violeta foi realizado somente para o tempo de 2 h de tratamento, com o objetivo de confirmar se nestas condições não haveria alteração do número de células entre as populações controles e tratadas. Não foi observada

alteração da viabilidade das quatro linhagens testadas após 2 h de tratamento com $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MI-D (Figura 12). Portanto, a condição de ensaio onde as células foram submetidas a 2 h de tratamento com $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MI-D foi selecionada para a realização dos testes de influência do MI-D sobre a produção de PGE_2 e expressão de COX-1 e COX-2 em células de melanoma humano e murino.

Como foi demonstrado que o MI-D possui atividade antiinflamatória em animais tratados com dose de 8 mg/kg, tornou-se importante verificar se a produção de PGE_2 e a expressão de COX-1 e COX-2 são afetadas nas células utilizadas neste trabalho.

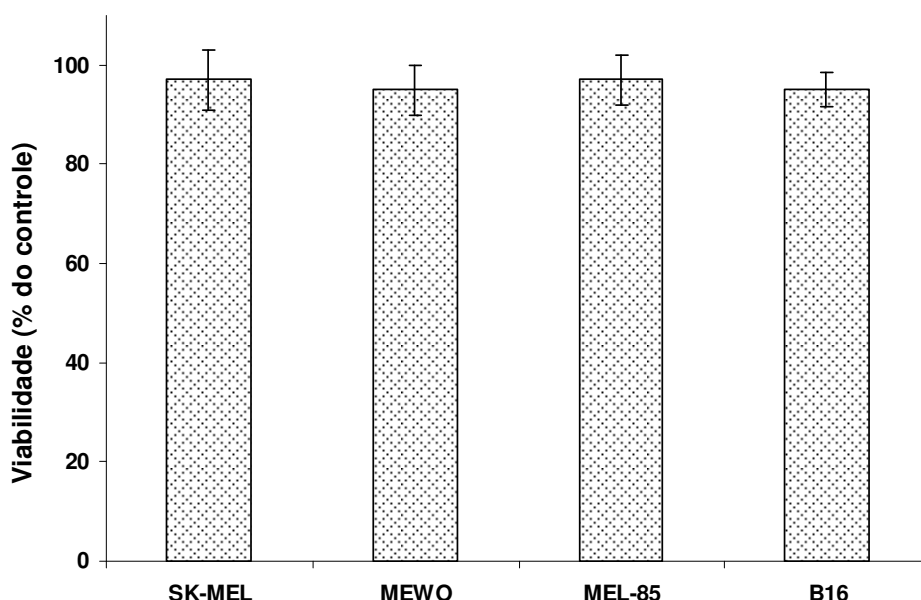


FIGURA 12 – ENSAIO DE VIABILIDADE POR MÉTODO DE CRISTAL VIOLETA EM CÉLULAS DE MELANOMA TRATADAS COM MI-D

FONTE: O autor (2008)

NOTA: Células SK-MEL, MEWO, MEL-85 e B16-F10 foram plaqueadas em placas de 96 poços, (5×10^4 células por poço). Cultivadas por 24 h em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 , com umidade controlada de 95% e tratadas com MI-D por 2 h em concentração de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$. O meio foi retirado, as células foram fixadas, coradas por cristal violeta e a intensidade da cor determinada por leitor de microplaca em comprimento de onda de 550 nm. O cálculo da viabilidade proporcional foi determinado em relação a absorbância média dos controles tratados com DMSO. As barras mostram média \pm DP de dois experimentos realizados em triplicata.

6.1.2 EFEITO DO MI-D NA PRODUÇÃO DE PGE₂ E EXPRESSÃO DA COX-1 E COX-2 POR CÉLULAS DE MELANOMA

Efeitos biológicos demonstrados para o MI-D incluem diminuição de crescimento de melanoma B16-F10 “*in vivo*” (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004a); diminuição de viabilidade de células de melanoma murino (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004a) e humano (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004b), diminuição da capacidade de adesão a componentes da matriz extracelular (SENFF-RIBEIRO, *et al.* 2004b), indicação de indução de apoptose (SENFF-RIBEIRO, 2004c); efeito antiinflamatório com diminuição da produção de PGE₂ “*in vivo*” em ratos (CARDOSO *et al.*, 2004). Portanto, é evidente a importância de pesquisar a influência do MI-D na produção de prostaglandina em diferentes linhagens de melanoma murino e humano, buscando relacionar este efeito com os efeitos biológicos já relatados. Desta forma, a relação entre a diminuição da produção de PGE₂ e efeitos antitumorais foi investigada neste estudo em ensaios com linhagens celulares de melanoma humano (SK-MEL, MEWO e MEL-85) e murino (B16-F10) tratadas com MI-D. Esta relação foi investigada buscando identificar, em condições de tratamento que não afetam a viabilidade, se há influência do MI-D na produção de PGE₂ e se esta influência, nas diferentes linhagens, segue a tendência de suscetibilidade encontrada em relação à viabilidade, quando as células são mantidas por períodos maiores nestas mesmas condições.

A super-expressão da COX-2 tem sido associada ao câncer (ALI *et al.* 2007; ZHA *et al.* 2004; DANDEKAR e LOKESHWAR, 2004; AMANO *et al.*, 2003; AN *et al.*, 2002; SENO *et al.*, 2002; WILLIAMS *et al.*, 2000). Drogas antiinflamatórias não esteróides são identificadas como protetores contra o câncer devido à atuação como inibidores da COX (ABDALLA *et al.*, 2005; ZHA *et al.*, 2004; DING *et al.*, 2003; HLA *et al.*, 1999). Para a identificação da ação de antiinflamatórios, ensaios de atividade da COX são desenvolvidos utilizando como indicador acúmulo de PGE₂ e

investigação nos níveis de expressão da enzima (HAMILTON *et al.*, 1999). Antiinflamatórios não esteróides agem inibindo a produção de PGE₂ por diminuição na expressão da enzima COX (XU *et al.*, 1999; KUNDU *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2007) ou por inibição da atividade enzimática sem alteração da expressão da enzima (HAMILTON *et al.*, 1999).

Foi demonstrado que as células de melanoma de linhagem humana (MEL-85, MEWO e SK-MEL) e murina (B16-F10) apresentam produção de PGE₂ (Figura 13 e 14), quando induzidas com ácido araquidônico (20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Observou-se grande variação nos níveis de PGE₂ produzidos pelas diferentes linhagens na condição de incubação testada. As células da linhagem B16-F10 apresentaram o menor nível de produção de PGE₂, 337 ± 31 pg/mL que as linhagens de melanoma humano. Estas apresentaram produção de 1,5 a 5 vezes maior em relação a B16-F10, sendo observados os valores de: 1857 ± 119 pg/mL para MEWO; 1552 ± 198 pg/mL para SK-MEL; 502 ± 58 pg/mL para MEL-85 (Figuras 13 e 14). Os resultados confirmam as informações já publicadas por Denkert *et al.* (2001) para as linhagens de melanoma humano MEWO e SK-MEL, porém não havia informações sobre a produção de prostaglandina por células das linhagens MEL-85 e B16-F10.

O efeito do MI-D na produção de PGE₂ foi testado em melanoma humano (MEL-85, MEWO, SK-MEL) e murino (B16-F10), após 2 h de tratamento em concentração de 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de MI-D em 0,12% de DMSO em meio de cultivo. Foi observada redução da síntese de PGE₂ após incubação das células de melanoma humano, com valores de 39% de inibição para SK-MEL e 57% de inibição para MEWO (Figura 13). Em células da linhagem MEL-85, a redução de PGE₂ ocorreu somente quando as células foram incubadas com 25 μM de MI-D, com valor de redução de 52% (Figura 13).

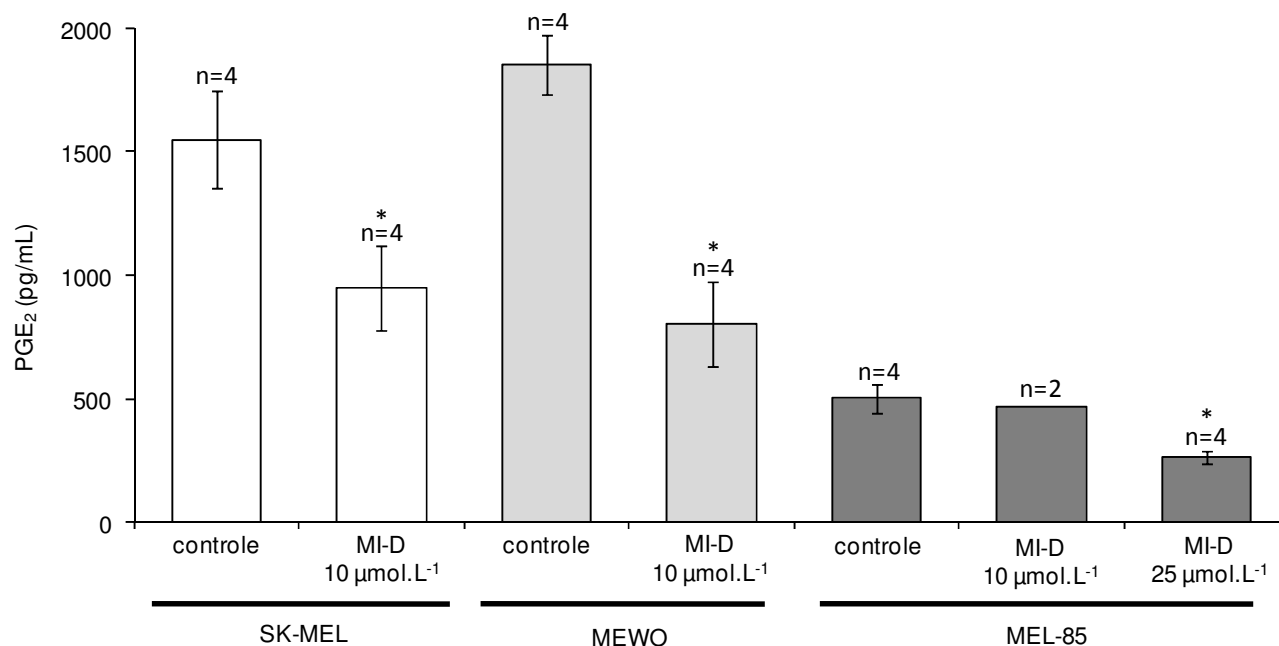


FIGURA 13 - EFEITO DO MI-D NA PRODUÇÃO DE PGE₂ POR CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO

FONTE: O autor (2008)

NOTA: Células das linhagens SK-MEL, MEWO e MEL-85 foram plaqueadas em placas de 12 poços (2×10^5 células por poço), incubadas por 24 h em estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, com umidade controlada de 95% e tratadas com MI-D 10 µmol.L⁻¹ 0,12% DMSO (SK-MEL e MEWO) e 25 µmol.L⁻¹ 0,12% DMSO (MEL-85) por 2 h, como indicado. As células do grupo controle foram tratadas com DMSO 0,12%. Posteriormente, as células foram incubadas por 1 h em meio suplementado com 20 µmol.L⁻¹ de ácido araquidônico. O sobrenadante foi separado centrifugado e submetido a imunoensaio "Prostaglandin E2 EIA - Monoclonal" Cayman Chemical Company, INC, para determinação da concentração de PGE₂ no meio. As barras mostram média ± DP. * p < 0,05.

Comparando os resultados encontrados de inibição de produção de PGE₂ pelo MI-D, com os resultados prévios de Senff-Ribeiro *et al.* (2004b) que investigou a susceptibilidade das células de melanoma humano ao MI-D, observa-se uma relação interessante entre as tendências de redução da produção de PGE₂ após 2 horas de tratamento com o MI-D e as alterações de viabilidade das linhagens testadas após 24 horas de tratamento (Tabela I), sendo que a linhagem MEWO apresentou maior redução de produção de PGE₂ e maior alteração de viabilidade em tratamento com 10 µmol.L⁻¹ de MI-D, seguida de MEL-85 em tratamento com 25 µmol.L⁻¹ de MI-D e SK-MEL em 10 µmol.L⁻¹ de MI-D (Tabela I). Em teste de proliferação celular estas linhagens não apresentaram crescimento celular nas mesmas condições acima

apresentadas (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004b). Desta forma, os efeitos inibitórios do MI-D sobre a produção de PGE_2 podem estar influenciando a perda de viabilidade devido à perda do efeito antiapoptótico e citoprotetor atribuído a PGE_2 , o que causaria um aumento da suscetibilidade das células a morte, ao longo do tempo.

Nesse sentido, Ali *et al.* (2007) identificaram diminuição de viabilidade e da proliferação celular em células endoteliais HUVECs, tratadas com inibidor específico de COX-2. Dandekar e Lokeshwar (2004) demonstraram que a supressão da expressão de COX-2 em células tumorais de câncer de próstata causa perda de viabilidade. Os autores também demonstraram que esta condição aumenta a sensibilidade destas células quando tratadas com drogas citotóxicas, indicando um efeito citoprotetor da COX-2.

TABELA I: COMPARAÇÃO DOS DADOS DE INIBIÇÃO DE PRODUÇÃO DE PGE_2 ENCONTRADOS PARA AS DIFERENTES LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO COM OS DADOS DE INIBIÇÃO DE VIABILIDADE DE Senff-Ribeiro *et al.* (2004B).

Linhagens	Inibição produção PGE_2 (2 h)	Redução viabilidade (24 h) Senff-Ribeiro <i>et al.</i> (2004b)
MEWO (10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$)	57%	77%
MEL-85 (25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$)	52%	56%
SK-MEL (10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$)	39%	~15%

A incubação de células B16-F10 com MI-D causou um aumento dose dependente na produção de PGE_2 (Figura 14), aumentando 153% e 197% após 2 h de tratamento com 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de MI-D, respectivamente. Apesar dos testes de produção de PGE_2 e expressão da COX terem ocorrido em condições consideradas aceitáveis em relação à viabilidade celular, (10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de MI-D por 2 h), as células B16-F10 mostraram maior suscetibilidade ao MI-D que as outras linhagens (Figuras 8 e 10). O mesmo foi observado por Senff-Ribeiro *et al.* (2003). Portanto, o resultado, aparentemente contraditório, sobre a produção de PGE_2 pode estar relacionado com a sensibilidade dessas células ao MI-D.

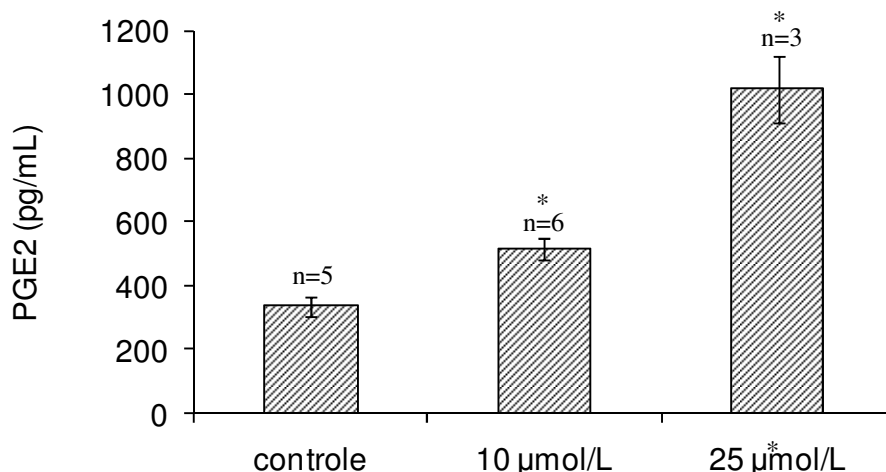


FIGURA 14 - EFEITO DO MI-D NA PRODUÇÃO DE PGE₂ POR CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16-F10

FONTE: O autor (2008)

NOTA: Células da linhagem B16-F10 foram plaqueadas em placas de 12 poços (2×10^5 células por poço), incubadas por 24 h em estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, com umidade controlada de 95% e tratadas com MI-D 10 ou 25 µmol.L⁻¹ em 0,12% DMSO por 2 h, como indicado. As células do grupo controle foram tratadas com DMSO 0,12%. Posteriormente, as células foram incubadas por 1 h em meio suplementado com 20 µmol.L⁻¹ de ácido araquidônico. O sobrenadante foi separado centrifugado e submetido a imunoensaio "Prostaglandin E2 EIA - Monoclonal" Cayman Chemical Company, INC, para determinação da concentração de PGE₂ no meio. As barras mostram média \pm DP. * p < 0,05.

Dandekar e Lokeshwar (2004) demonstraram que células de câncer de próstata (PC-3ML), tratadas com as drogas quimioterápicas 3-(6-demetil-6-deoxi-4-dedimetilamino) tetraciclina e taxotera, por 24 horas apresentaram diminuição da viabilidade acompanhada de aumento na produção de PGE₂. Estes autores realizaram estes mesmos testes em células com supressão da expressão da COX-2 através de transfecção de cDNA antisense de COX-2 humana induzível por doxiciclina (sistema Tet-on) cultivadas em meio com doxiciclina e demonstraram, que nestas condições, não ocorreu aumento de PGE₂, assim como, foi detectado um aumento na sensibilidade das células a estas drogas. Estes resultados indicaram que o aumento da PGE₂ está relacionado à atividade da COX-2 e que esta atividade tem um efeito citoprotetor nas células estudadas.

A atividade antiinflamatória de alguns derivados 1,3,4 tiadiazóis é reconhecida. Testes de edema de pata, em rato, com compostos da série N-[5-oxo-4-(arilsulfonil)-4,5-1,3,4 tiadiazóis-2 il] amidas (SCHENOME *et al.*, 2006) e

camundongo com compostos da série 2-(2-naftiloximetil)-5 amino substituído- 1,3,4 tiadiazóis (PALASKA *et al.*, 2002) foram realizados caracterizando destes compostos como antiinflamatórios. O estudo de uma série de derivados 1,3,4 tiadiazóis em relação influência sobre a atividade das enzimas lipoxigenase e ciclooxigenase resultou na identificação do composto 5-[3,5-bis(1,1-dimetiletil)-4-hidroxifenil-1,3,4 tiadiazol-2(3H) – tiona como um potente inibidor das duas enzimas (MULLICAN, *et al.*, 1993). Um estudo de varredura da ação de 15 derivados 2-amino 5-sulfanil 1,3,4 tiadiazóis sobre a atividade das enzimas COX-1 e COX-2 produziu resultados bastante variados e interessantes. Estes ensaios de inibição foram realizados medindo a atividade de COX-1 e COX-2 isoladas de ave, através de método colorimétrico que mede a produção de N,N,N,N-tetrametil-p-fenilenediamina (TMPD) oxidado pela atividade hidroperoxidase da enzima COX. Um número de 6 compostos apresentaram inibição não seletiva das duas isoformas; 4 compostos apresentaram inibição seletiva da COX-1; 1 composto apresentou indução da atividade das duas isoformas e 4 compostos apresentaram efeitos opostos sobre a atividade das duas isoformas, sendo caracterizados como inibidores seletivos da COX-2 e indutores da atividade da COX-1 (SHARMA *et al.*, 2008). Estes resultados indicam que compostos tiadiazólicos podem apresentar uma grande diversidade de mecanismos de ação sobre o sistema de produção de prostaglandinas.

Em relação a especificidades inibitórias sobre a COX humana e murina, Ramesha (1995), utilizando diferentes classes de antiinflamatórios demonstrou diferenças nos efeitos farmacológicos sobre a COX de rato e humana sugerindo diferenças na afinidade e natureza das interações. Sabe-se ainda que embora as isoformas COX-1 e COX-2 humanas sejam aproximadamente 60% idênticas (HLA *et al.*, 1999) inibidores seletivos podem afetar estas isoformas de forma bastante diferente (RIENDEAU *et al.*, 1997) e que mutação com a substituição de um único aminoácido pode ser suficiente para uma inibição seletiva (GIERSE *et al.*, 1996).

A fim de identificar a presença das isoformas da enzima COX nas linhagens, assim como identificar possível efeito do MI-D na expressão desta enzima, foi

realizado “westernblotting” de proteínas de membrana de células das linhagens B16-F10 e SK-MEL, após tratamento com $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MI-D por 2 h. Estas linhagens foram selecionadas por representarem os dois padrões encontrados nos ensaios de produção de PGE_2 em células tratadas com MI-D, sendo que a linhagem SK-MEL apresentou diminuição na produção de PGE_2 e a linhagem B16-F10 apresentou aumento de PGE_2 .

Foi observado que as duas isoformas, COX-1 e COX-2 são expressas de forma constitutiva nas duas linhagens investigadas (Figura 15). Estes resultados, confirmam a afirmação de que a COX-2 é expressa constitutivamente em melanomas (DENKERT *et al.*, 2001; KAKIUCHI *et al.*, 2002) e sugerem que a COX-2 está contribuindo, efetivamente, para a produção de PGE_2 encontrada nas linhagens SK-MEL e B16-F10. O tratamento das células com $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MI-D, por duas horas, não causou alteração nos níveis de expressão das enzimas COX-1 e COX-2 nas duas linhagens (Figura 15), indicando que nesta concentração o MI-D altera a produção de PGE_2 sem afetar a expressão da COX.

Hamilton *et al.* (1999) demonstraram que a influência de um antiinflamatório na expressão da COX pode estar relacionada a concentração da droga. Os autores testaram duas drogas, leflunomida e A771726 (ácido N-(4-trifluoro metil fenil)-2 ciano, 3-hidroxi crotonico amida), observando inibição, dependente da dose, na produção de PGE_2 , com valores de IC_{50} de 2,2 e $3,5 \mu\text{g/mL}^{-1}$ respectivamente. Ao realizarem testes de influência das drogas na expressão da COX-2, os autores observaram ausência de efeito da droga leflunomida na expressão da COX-2, até a concentração máxima possível de solubilização no veículo utilizado ($30 \mu\text{g/mL}^{-1}$) e inibição da expressão pela droga A771726 somente em valores muito superiores (acima de $300 \mu\text{g/mL}^{-1}$) aos identificados nos ensaios de inibição. Estes resultados indicam que a inibição da produção de PGE_2 em baixas concentrações de antiinflamatório pode ocorrer sem alteração da expressão da COX, porém, em concentrações mais altas da droga, poderá ocorrer a diminuição da expressão da enzima.

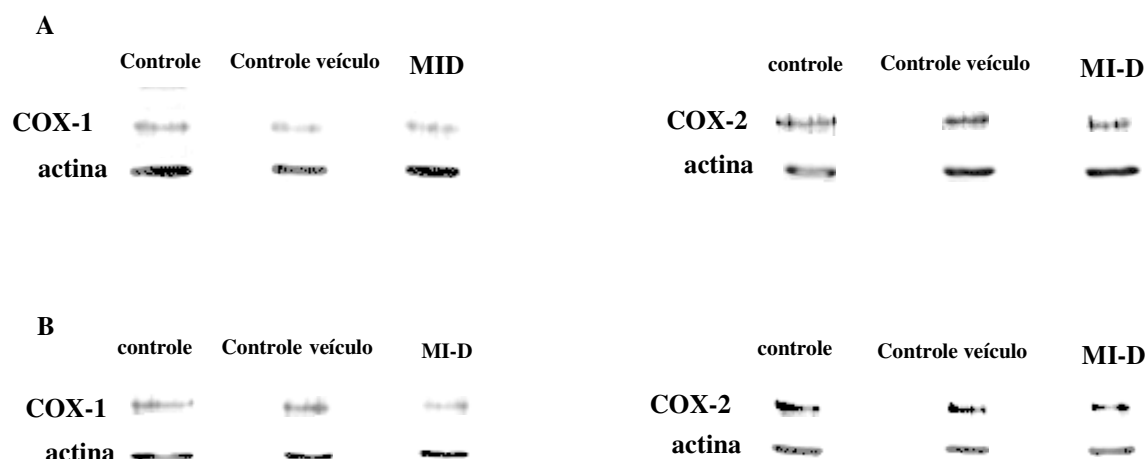


FIGURA 15- ENSAIO DE IMUNODETECÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO MI-D NO NÍVEL DE EXPRESSÃO DAS ENZIMAS COX-1 E COX-2 EM LINHAGENS DE MELANOMA

FONTE: O autor (2008)

NOTA: Células da linhagem B16-F10 e SK-MEL (10^7 células) foram transferidas para garrafas de cultivo 150 cm², incubadas por 24 h em estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, com umidade controlada de 95%, tratadas com MI-D 10 µmol.L⁻¹ em 0,12% DMSO por 2 h. Foram preparados grupo controle (representa o nível de expressão de células sem tratamento) e o controle do veículo (representa o nível de expressão de células tratadas com 0,12% DMSO). As células foram coletadas, centrifugadas, incubadas com tampão de lise e realizada separação eletroforética de 100 µg de proteína. Após a transferência para membrana de nitrocelulose, as regiões correspondentes ao peso da ciclooxigenase e actina foram separadas e incubadas com anticorpos antiCOX1, antiCOX2 e antiactina. A revelação foi realizada com anticorpo secundário anti IgG ligado a peroxidase e utilização de substrato quimioluminescente para peroxidase da Sigma. A) SK-Mel; B) B16-F10. Para a análise dos resultados foram utilizados os valores numéricos das intensidades das bandas em relação aos valores das intensidades das bandas de actina. Figura representativa de 3 experimentos.

Outra possibilidade para explicar os resultados em relação à expressão da COX pode estar relacionada a uma diferença no alvo proposto. São encontradas três enzimas na via de produção de PGE₂: a fosfolipase A, que atua na liberação de ácido araquidônico a partir de fosfolípidos de membrana, a ciclooxigenase, que utiliza este ácido araquidônico para formar como produto intermediário a PGH, que será convertido a PGE₂ através da atividade da enzima PGES (FOEGH e RAMWELL, 2006; HECKER *et al.*, 1998). Dentro dos ensaios propostos, o ácido araquidônico foi adicionado ao meio em condição de concentração saturante, eliminando a importância da fosfolipase A nos resultados encontrados, porém uma possível inibição da enzima PGES também iria causar diminuição da produção de PGE₂ (KAMEI *et al.*, 2003). Embora estudos indiquem que a PGES é alvo de inibidores antiinflamatórios glucocorticóides (MURAKAMI *et al.*, 2002) e compostos

derivados de 1,3,4 tiadiazóis apresentam efeito inibitório sobre a COX-2 (SHARMA *et al.*, 2008; SONG *et al.*, 1999), esta possibilidade não pode ser totalmente descartada.

O tratamento com MI-D causa diminuição da produção de PGE₂ em células de melanoma humano e esta diminuição ocorre sem alterar a expressão das enzimas COX-1 e COX-2 na linhagem SK-MEL. Estes resultados confirmam o efeito antiinflamatório, previamente relatado para o MI-D (CARDOSO *et al.*, 2004). Porém é importante enfatizar que os resultados em célula murina demonstram que o mecanismo de ação de drogas em linhagens de melanoma humano e murino podem ser bastante diferentes e generalizações devem ser feitas com cautela.

6.2 ENSAIOS DE METABOLIZAÇÃO DO MI-D

O estudo de novas drogas inclui o esclarecimento sobre sua metabolização e, em especial, o efeito sobre a atividade do complexo P450, determinando se a molécula é um substrato ou um inibidor dessas enzimas e consequentemente, se é metabolizado ou influencia o metabolismo de outras drogas (BERKOWITZ e KATZUNG, 1998). Este complexo multienzimático, cuja oxidase final é uma hemoproteína denominada citocromo P450, encontra-se presente em diferentes tecidos como rim, pulmão, pele, intestino, córtex da adrenal, testículos, placenta entre outros, mas é particularmente ativo no fígado (ORELLA e GUARJADO, 2004). A proteína citocromo P450 está presente, principalmente, no retículo endoplasmático e em mitocôndrias, voltada para a superfície citoplasmática e ancorada na membrana através de sua região N-terminal (BLACK e MARTIN, 1994, OMURA, 1999). Para o estudo da metabolização do MI-D, foram realizados ensaios enzimáticos utilizando a fração microsomal de hepatócitos de camundongo, que corresponde à reorganização do retículo endoplasmático em inúmeras vesículas,

após o processo de homogeneização e isolamento por ultracentrifugação a partir do tecido hepático e caracterização do metabólito como descrito a seguir.

6.2.1 ANÁLISE DE METABOLIZAÇÃO DO MI-D E SEPARAÇÃO E DETECÇÃO DE POSSÍVEL METABÓLITO POR HPLC

A separação e detecção dos possíveis produtos de metabolização do MI-D foram realizadas através de HPLC em condição de gradiente com e sem extração líquido-líquido, com a finalidade de selecionar a metodologia mais eficiente. O pico referente ao composto MI-D (pico 5) pode ser evidenciado em 38 min da corrida cromatográfica (Figura 16). Os resultados cromatográficos de amostras sem extração, após 5 min de incubação do MI-D com microsossoma a 37 °C, demonstraram 4 picos (Figura 16) em 1,9 min (pico 1); 7,3 min (pico 2); 9,4 min (pico 3) e 10,6 min (pico 4) da corrida cromatográfica, sendo que o pico 1 corresponde ao NADPH (tempo de retenção confirmado pela injeção de padrão – dado não mostrado). Quando as amostras foram extraídas com clorofórmio e secadas em rota evaporador o cromatograma apresentou um pico adicional em 9,8 e ausência do pico 1. Observou-se melhor resolução do cromatograma de amostras não extraídas, portanto a metodologia sem extração passou a ser utilizada para os ensaios posteriores.

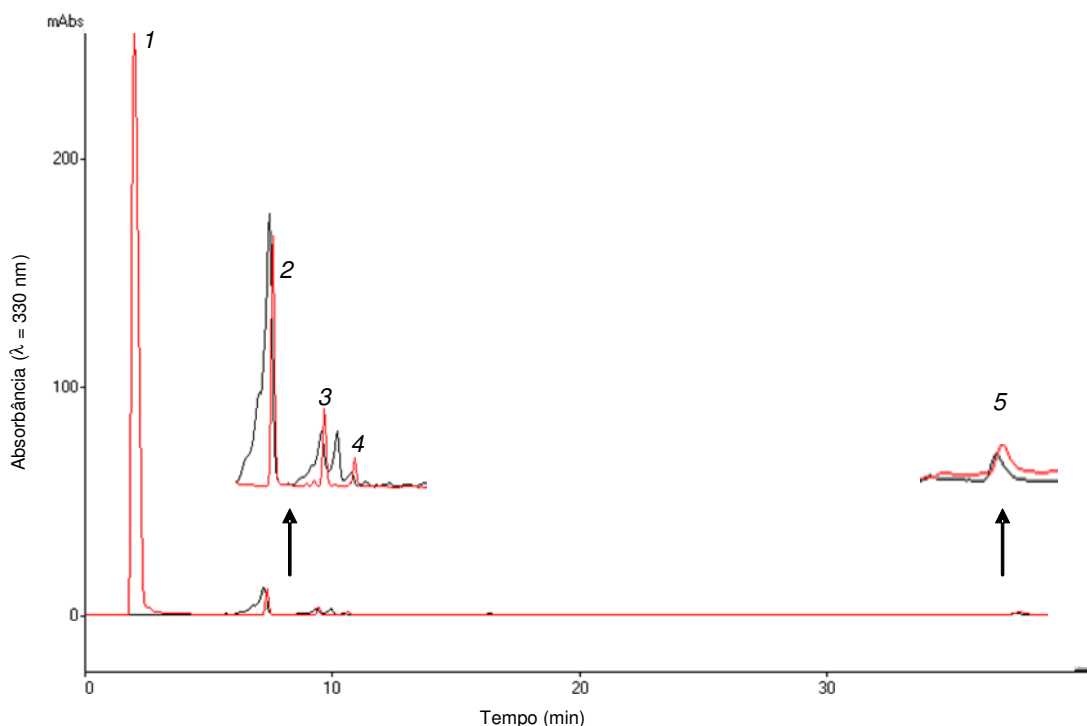


FIGURA 16 - ANÁLISE DA METABOLIZAÇÃO DO MI-D por HPLC COM E SEM PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DAS PREPARAÇÕES MICROSSOMAIS.

FONTE: O autor (2008)

NOTA: MI-D, em concentração de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ foi incubado em meio contendo MgCl_2 6 mmol.L^{-1} , tampão fosfato 20 mmol.L^{-1} , pH 7,4, NADPH 1 mmol.L^{-1} e 1 mg de proteína microssomal por mL, em o volume final de $1,2 \text{ mL}$, por 5 min . Após incubação foi realizada extração com clorofórmio, secagem em rota evaporador, ressuspensão em acetonitrila e análise por HPLC. Alternativamente as mesmas condições de incubação foram preparadas, finalizadas com $300 \mu\text{L}$ de acetonitrila, centrifugadas e analisadas diretamente por HPLC sem extração. Condições cromatográficas: coluna Hypersil C18 $250 \times 4,6 \text{ mm}$ $10 \mu\text{m}$ (Metachem), Fase móvel em sistema gradiente de acetonitrila em 5 mmol.L^{-1} de ácido acético glacial pH 4,6. Fluxo de 1 mL/min . ——— cromatograma após procedimento de extração; ——— cromatograma após centrifugação da amostra sem procedimento de extração. Picos: 1) NADPH; 2, 3 e 4) Possíveis metabólitos e 5) MI-D.

A comparação das amostras de meio de reação contendo MI-D sem incubação e incubadas em tempos de 2,5, 5 e 10 min demonstraram diminuição da área do pico referente ao MI-D e progressivo aumento da área do pico 2, dependente do tempo, sugerindo que este pode ser um importante produto da reação de metabolização sendo então denominado como MET (Figura 17 e 18). As variações dos picos de MI-D e MET foram maiores no tempo de 2,5 minutos em relação à reação sem incubação, indicando que a metabolização ocorreu principalmente neste período. A partir de 2,5 minutos as mudanças nos picos de MI-D e MET foram pequenas, mas ainda foi possível identificar diminuição do pico

relativo ao MI-D e pequenos aumentos no pico relativo ao MET. Os possíveis metabólitos, referentes aos picos 3 e 4 não foram investigados.

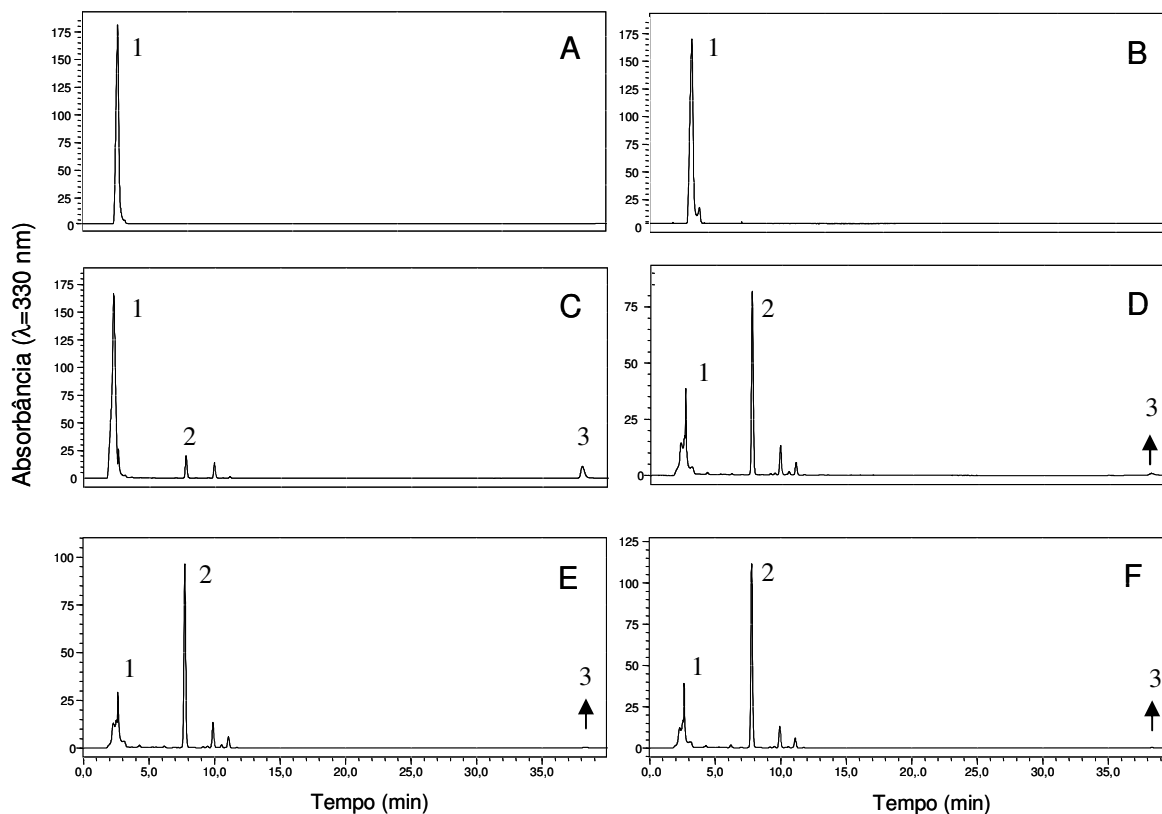


FIGURA 17 - CROMATOGRAMAS APÓS POSSÍVEL METABOLIZAÇÃO DO MI-D

FONTE: O autor (2008)

NOTA: MI-D ($25 \mu\text{mol.L}^{-1}$) foi incubado em meio contendo MgCl_2 6 mmol.L^{-1} , tampão fosfato 20 mmol.L^{-1} , pH 7,4, NADPH 1 mmol.L^{-1} e 1 mg de proteína microssomal por mL, em um volume final de $1,2 \text{ mL}$. Após incubação foi adicionada a amostra $300 \mu\text{L}$ de acetonitrila, a qual foi centrifugada e o sobrenadante analisado por HPLC. Condições cromatográficas: coluna Hypersil C18 $250 \times 4,6 \text{ mm}$ $10 \mu\text{m}$ (Metachem), Fase móvel em sistema gradiente de acetonitrila em 5 mmol.L^{-1} de ácido acético glacial pH 4,6. Fluxo de 1 mL/min . A-B) Meio de reação com microssoma e sem MI-D; A) sem incubação; B) após incubação por 5 min a 37°C . C-F) Meio de reação com microssoma e MI-D. C) sem incubação; D) incubação por $2,5 \text{ min}$. E) incubação por 5 min e F) incubação por 10 min . 1) região picos baixa resolução; 2) pico de possível produto de metabolização (MET); 3) pico do MI-D.

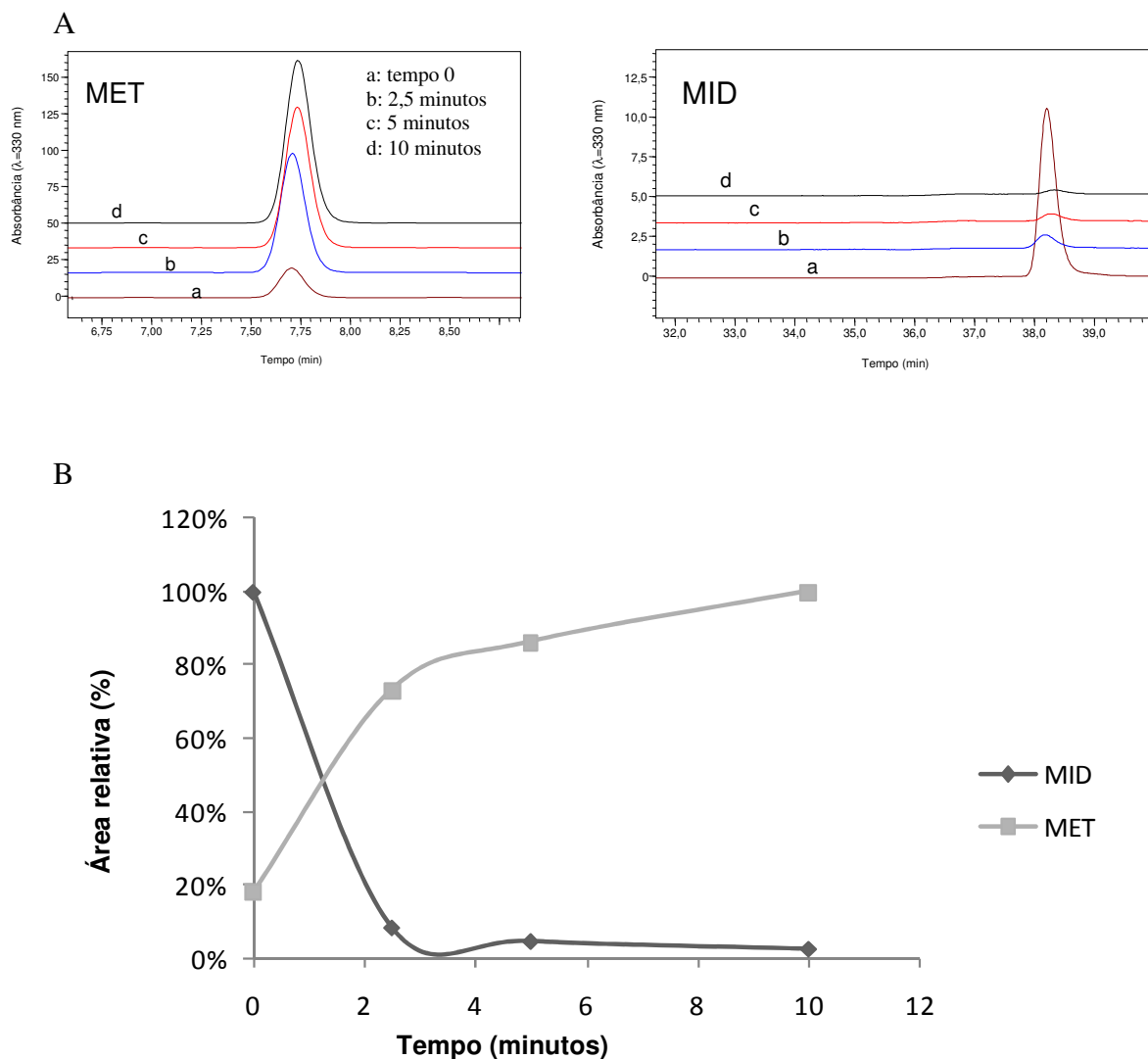


FIGURA 18 - VARIAÇÃO RELATIVA DAS ÁREAS DOS PICOS DE MI-D E MET EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO.

FONTE: O autor (2008)

NOTA: A) Identificação ampliada das regiões dos picos de MET e MID a partir dos cromatogramas de amostras incubadas ao longo do tempo. B) gráfico da variação relativa das áreas dos picos demonstrados em (A). As linhas representam as áreas relativas dos picos de MI-D e MET dos cromatogramas mostrados na figura 17. 100% do MI-D = área do pico de 219.875 e 100% de MET = área do pico de 1.038.413.

Estes resultados indicam que o MI-D é metabolizado pelo complexo multienzimático citocromo P450 presente em fração microsomal de fígado de camundongo, gerando um produto com tempo de retenção menor que o MI-D em análise por HPLC, sugerindo que este metabólito apresenta uma característica polar,

a qual é responsável pela diminuição de sua interação com a fase estacionária da coluna C₁₈.

Analisando o espectro do MI-D na faixa entre 200 e 750 nm, pode-se verificar 4 picos de absorbâncias característicos para esta molécula, em 200, 250, 330 e 405 nm. Comparações entre os espectros do MI-D e do possível metabólito separado por HPLC, evidenciam uma grande semelhança no padrão de absorção na faixa de 400 a 750 nm, porém observa-se um desvio do pico de absorbância em 330 nm do MI-D para 310 nm no possível metabólito e o aparecimento de um pico de absorbância em 210 nm, que não está presente no MI-D (Figura 19).

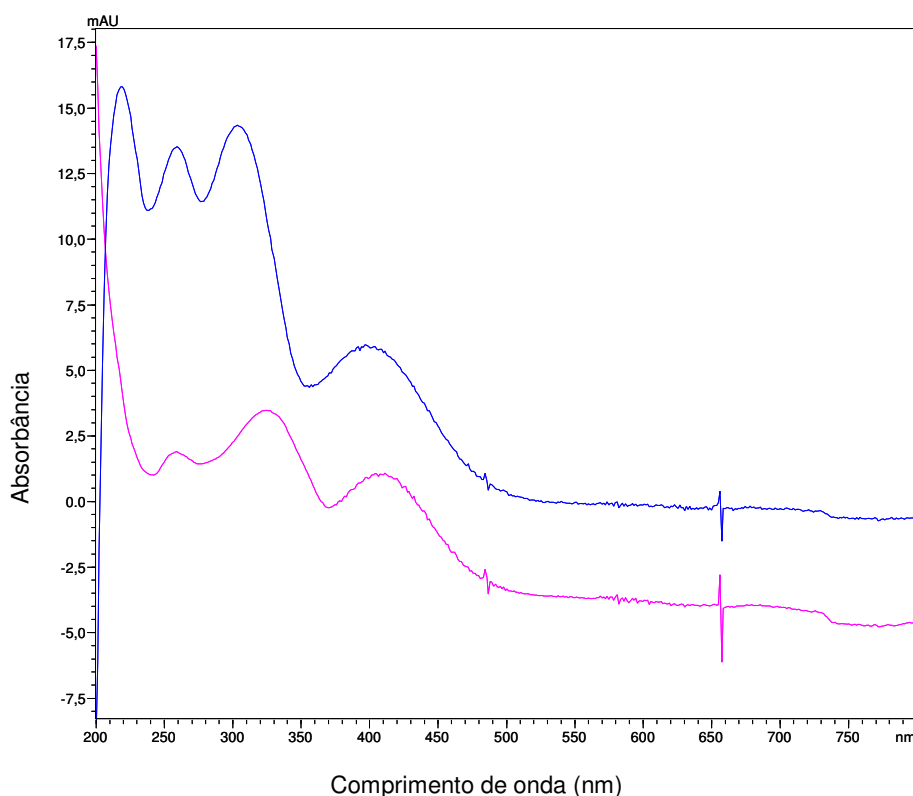


FIGURA 19 - ESPECTRO DO POSSÍVEL METABÓLITO APÓS INCUBAÇÃO EM MEIO DE REAÇÃO POR 10 MIN A 37 °C

FONTE: O autor (2008)

NOTA: O meio de reação contendo MgCl₂ 6 mmol.L⁻¹, tampão fosfato 20 mmol.L⁻¹, pH 7,4, NADPH 1 mmol.L⁻¹ e 1 mg de proteína microsomal por mL, em o volume final de 1,2 mL. A concentração de MI-D utilizada para reação e padrão foi de 25 µmol.L⁻¹ e a concentração de DMSO foi de 0,12%. Amostra sem extração, adição de 300 µL de acetonitrila, centrifugação por 20 min a 13.000 rpm e injeção de 50 µL do sobrenadante. Coluna Hypersil C18 250 x 4,6 mm 10 µm (Metachem), Fase móvel em sistema gradiente de acetonitrila em 5 mmol.L⁻¹ de ácido acético glacial pH 4,6. Fluxo de 1 mL/min. Após separação foi extraído espectro do MI-D em acetonitrila (linha rosa) e do pico do possível metabólito (linha azul) em intervalo de comprimento de onda de 200 a 800 nm.

Considerando as diferenças encontradas no tempo de retenção entre o MI-D e o metabólito, conclui-se que estas duas moléculas são diferentes, porém as modificações na estrutura parecem ser pequenas uma vez que o espectro de MET foi bastante similar ao do MI-D (Figura 19). A nova banda em 210 nm pode ser indicativa de hidroxilação de um dos substituintes benzênicos formando um grupamento fenol, pois esta mesma diferença é encontrada entre os espectros do benzeno e do fenol (SKOOG *et al.*, 1998). A mudança da banda de absorção do espectro do MI-D em 330 nm para um comprimento de onda menor no espectro de MET pode indicar modificações no sistema de conjugação da molécula (MÉIER *et al.*, 2003), provavelmente no grupo fenilamina.

6.2.2 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

Foram realizadas análises do composto MET purificado por HPLC, por espectrometria de massa, para verificar mais detalhes de sua estrutura e confirmar nossa hipótese. Foi identificado um íon com massa $m/z = 465$, gerando íons filhos, após indução de fragmentação em câmara de colisão do equipamento (Figura 20). Análises das diferenças de massas entre o MI-D ($m/z = 401$) e MET ($m/z = 465$) indicam que o composto MET apresenta 4 grupos hidroxila adicionais comparado ao MI-D, os quais podem ser formados a partir da principal reação catalizada pelo sistema P450. Com base nos sinais m/z do espectro de MET, foi indicada a estrutura proposta para MET ($[MI-D+4O]^+$), com prováveis locais de fragmentação e locais de possíveis hidroxilações (Figura 20A). Após ensaio de fragmentação foram encontrados os íons $m/z = 137$, $m/z = 219$ e $m/z = 301$, sendo propostas estruturas para $m/z = 137$ e $m/z = 301$, porém não havendo proposta de estrutura para $m/z = 219$ (Figura 20B). Apesar destas análises não garantirem a determinação exata da

posição de cada hidroxila, os resultados apresentam informações suficientes de que o MI-D é transformado pelo sistema P450.

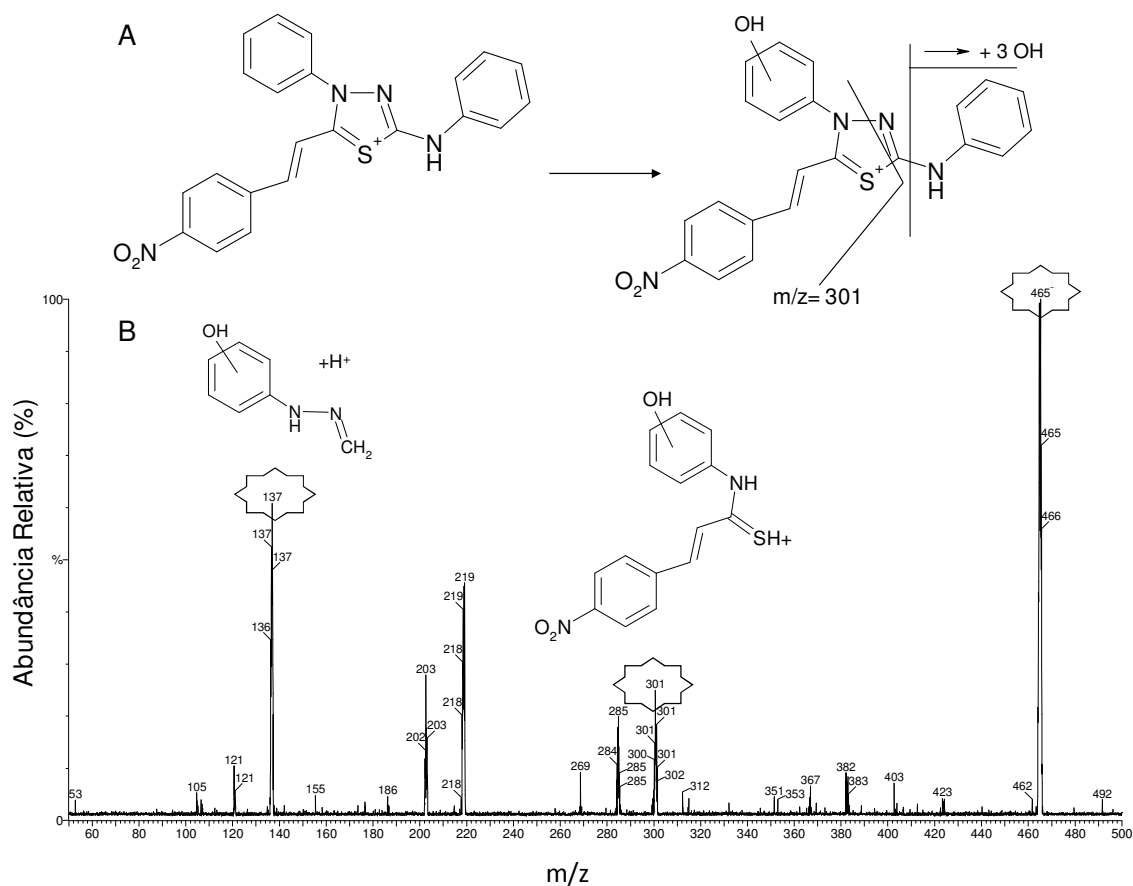


FIGURA 20 - ESPETRO MS/MS DO COMPOSTO MET E POSSÍVEIS ESTRUTURAS DOS ÍONS FILHOS.

FONTE: O autor (2008)

NOTA: O meio de reação contendo MgCl_2 6 mmol.L^{-1} , tampão fosfato 20 mmol.L^{-1} , pH 7,4, NADPH 1 mmol.L^{-1} e 1 mg de proteína microsomal por mL, em o volume final de 1,2 mL. A concentração de MI-D utilizada para reação e padrão foi de 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e a concentração de DMSO foi de 0,12%. Amostra com adição de 300 μL de acetonitrila, centrifugação por 20 min a 13.000 rpm e injeção de 50 μL do sobrenadante. Coluna Hypersil C18 250 x 4,6 mm 10 μm (Metachem), Fase móvel em sistema gradiente de acetonitrila em 5 m.mol.L^{-1} de ácido acético glacial pH 4,6. Fluxo de 1 mL/min. O composto MET foi isolado por HPLC e posteriormente analisado por espectrometria de massa. A) estrutura do MI-D e proposta de estrutura para o íon 465 m/z. B) Espectro de fragmentação de MET, modo positivo MS/MS, com indicação de possíveis estruturas associadas aos sinais m/z = 137 e m/z = 301.

6.2.3 ANÁLISE DA METABOLIZAÇÃO DO MI-D *IN VIVO*

A fim de investigar a correlação entre ensaios de metabolização *in vitro* e ensaios *in vivo*, assim como comprovar a importância da metodologia padronizada para o estudo de metabolização do MI-D, considerando futuras investigações de farmacocinética, foram realizados ensaios *in vivo*, em camundongos induzidos com fenobarbital e tratados com MI-D. Nestes ensaios foi identificada a presença de MET em plasma e urina dos animais tratados com MI-D após 1, 2 e 3 horas de tratamento, analisadas por HPLC (Figura 21).

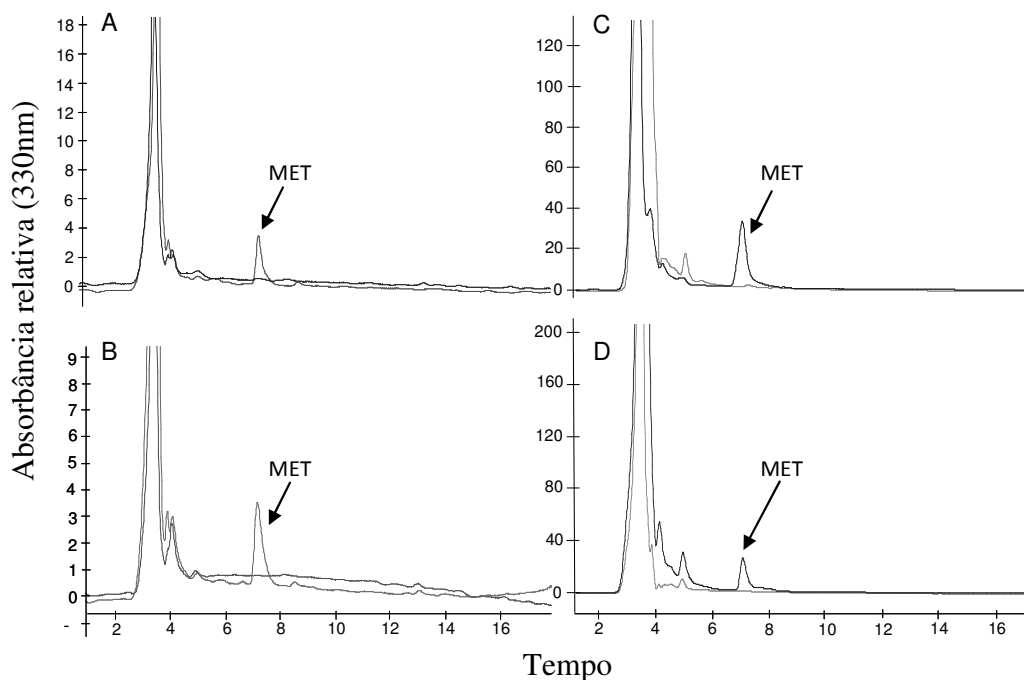


FIGURA 21 - DETECÇÃO DE MET EM AMOSTRAS DE PLASMA E URINA DE CAMUNDONOS TRATADOS COM MI-D

FONTE: O autor (2008)

NOTA: Os animais foram induzidos com fenobarbital (dose diária de 80 mg/kg por 3 dias) e tratados com MI-D (50 mg/kg) em DMSO/PBS 50% via injeção intraperitoneal. Após 1, 2 e 3 horas de tratamento foram coletadas amostras de sangue e urina. Ao plasma sanguíneo foi adicionado a 40% do volume de acetonitrila e centrifugado, sendo coletado o sobrenadante. A urina foi centrifugada e coletado o sobrenadante. Ambos foram analisados por HPLC com injeção de 50 μ L. Condição cromatográfica: coluna Hypersil C18 250 x 4,6 mm 10 μ m (Metachem), Fase móvel em sistema gradiente de acetonitrila em 5 mmol.L⁻¹ de ácido acético glacial pH 4,6. Fluxo de 1 mL/min. A) e B) cromatogramas de amostras de plasma após 1 e 2 horas de tratamento com MI-D, respectivamente. O pico referente ao produto de metabolização identificado em ensaios *in vivo* está indicado (MET). C) e D) cromatogramas de amostras de urina após 2 e 3 horas de tratamento com MI-D, respectivamente. Linhas onde não são observados os referidos picos de MET correspondem a amostras de animais controles tratado com o veículo. Estes cromatogramas são representativos de experimento realizado em triplicata.

O composto foi identificado através de comparação com o produto de metabolização detectado em ensaios *in vitro* (não mostrado), assim como em comparação com amostras de animais tratados com o veículo da droga.

A comparação do metabolismo de drogas em modelos *in vitro* e *in vivo* é importante para comprovar os achados *in vitro* e determinar a via de excreção do metabólito (BI *et al.* 2008; ERVE, *et al.*, 2008). Bi *et al.* (2008) realizou estudo de metabolização de lefucoxib (5-(3,4-dimetil-fenil)-1-metanosulfonil-3-trifluorometil-pirazol) em ratos, demonstrando que os metabólitos hidroxilados os principais produtos de metabolização, sendo identificados *in vitro*, utilizando frações microsomais e também em sangue, urina e fezes de animais tratados com a droga. Porém as análises demonstraram diferenças nos padrões de metabolização *in vitro* e *in vivo*, sendo observados dois metabólitos, M1 (metabólito mono-hidroxilado) e M2 (metabólito di-hidroxilado), em sangue, fezes e urina, mas somente o metabólito identificado como M2 foi observado em metabolização realizada em fração microsomal. Em estudo *in vivo* foi detectado a metabolização do MI-D através da identificação do metabólito MET em plasma sanguíneo e em urina de camundongos a partir de 1 h de tratamento, comprovando a metabolização e demonstrando uma das vias de eliminação do metabólito.

Os estudos de metabolização *in vitro* demonstraram que o MI-D é metabolizado pelo sistema P450 gerando um produto identificado através de análise por HPLC e denominado de MET. As variações encontradas em comparações dos espectros do MI-D e do metabólito, assim como em estudos por espectrometria de massa sugerem reação de hidroxilação, a qual é a principal via de reação do sistema P450 (COON, 2005; RENDIC, 2002). Esta reação é caracterizada pela transformação da molécula original em um produto mais polar e, portanto, com maior facilidade de excreção (OMURA, 1999). Os principais produtos de metabolização por hidroxilação pelo sistema P450 são compostos mono-hidroxilados (BI *et al.* 2008; VÁCLAVÍKOVÁ, *et al.*, 2004; HARVEY, 1999), porém compostos di-hidroxilados foram encontrados como produtos de metabolização de paclitaxel (taxol)

(VÁCLAVÍKOVÁ, *et al.*, 2004), di e tri-hidroxilados, após metabolização de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (HARVEY, 1999) e tetra-hidroxilações podem ser encontradas em metabolização de dibenzo[a,e]fluoranteno (SAGUEM, *et al.*, 1983).

Os estudos de espectrometria de massas não foram suficientes para determinar a estrutura definitiva do metabólito encontrado, sendo ainda necessário o esclarecimento através de estudos de ressonância magnética nuclear para a elucidação da estrutura. Porém, estes resultados são importantes para nortear futuras investigações farmacológicas com relação à metabolização e possíveis interações *in vivo*.

6.2.4 ANÁLISE DE METABOLIZAÇÃO DO MI-D POR ESPECTROFLUORIMETRIA

6.2.4.1 IDENTIFICAÇÃO DA METABOLIZAÇÃO

Uma das estratégias utilizadas para avaliar a metabolização do MI-D foi a realização de ensaios fluorimétricos utilizando a etoxiresorufina e benziloxiresorufina - substratos preferenciais das isoformas da família 1A (CYP1A) e 2B (CYP2B) do citocromo P450, respectivamente e utilizados como marcadores para investigação de metabolização de drogas em mamíferos (UMEHARA *et al.*, 2002; SHIMADA *et al.*, 2002; NIWA *et al.*, 2004). Como se observa na figura 22 e 23 a metabolização da etoxiresorufina e benziloxiresorufina resultam no produto fluorescente resorufina, promovendo um aumento do sinal de fluorescência. Inesperadamente, quando os ensaios foram realizados em presença de MI-D houve um aumento da fluorescência em relação à etoxiresorufina e benzilresorufina, sugerindo que o MI-D é metabolizado à um ou mais produtos também fluorescentes. Se por um lado esta informação é muito importante, pois possibilita que o metabolismo do MI-D seja

acompanhado por fluorescência, por outro, o objetivo inicial que era o de investigar se o MI-D iria interferir na metabolização dos substratos específicos das famílias (CYP1A) e 2B (CYP2B), tornou-se inalcançável, uma vez que na fração microsomal utilizada estavam presentes também outras isoformas do P450 que poderiam estar metabolizando o MI-D a produtos fluorescentes. Para certificar-se que a fluorescência observada era mesmo correspondente a produto/produtos de metabolização do MI-D, ensaios controles foram feitos na ausência de substrato (etoxiresorufina ou benziloxiresorufina e MI-D) e presença de NADPH; ausência de etoxiresorufina ou benziloxiresorufina e NADPH, em presença de MI-D. Nestes ensaios não se observou emissão de fluorescência, descartando-se, assim, a interferência dos constituintes do sistema, principalmente do MI-D, nos resultados obtidos.

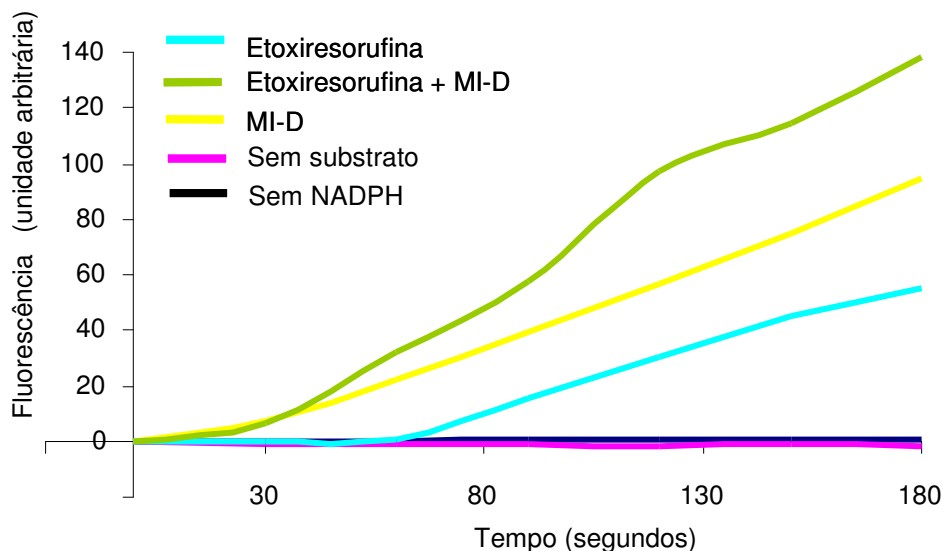


FIGURA 22 - ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA DO MI-D E SEUS PRODUTOS NA PRESENÇA DA ETOXIRESORUFINA

FONTE: O autor (2008)

Nota: Reação de metabolização da etoxiresorufina (5 mmol.L^{-1}) em $100 \text{ }\mu\text{g/mL}$ de proteína microssomal, $0,12\%$ DMSO, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 7,4), na presença ou ausência de NADPH (250 mmol.L^{-1}). — metabolização da etoxiresorufina; — metabolização da etoxiresorufina na presença do MI-D ($25 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$); — Metabolização do MI-D ($25 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$); — meio de reação sem substrato; — Meio de reação com MI-D ($25 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$) e sem NADPH.

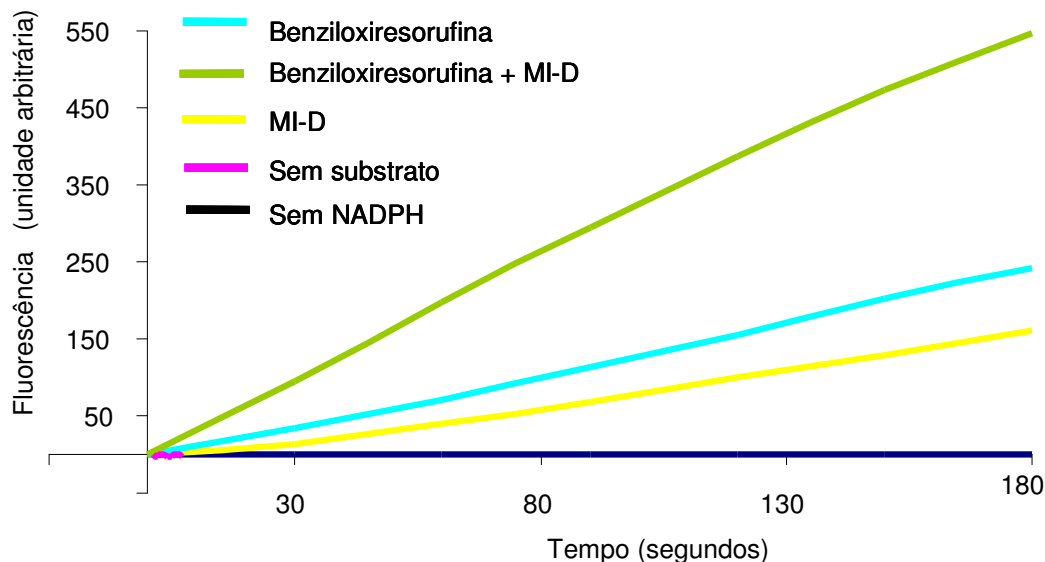


FIGURA 23 - ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA DO MI-D E SEUS PRODUTOS NA PRESENÇA DA BENZILOXIRESORUFINA

FONTE: O autor (2008)

Nota: Reação de metabolização de Benziloxiresorufina (5 mmol.L^{-1}) em $100 \text{ }\mu\text{g/mL}$ de proteína microssomal, $0,12\%$ DMSO, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 7,4), na presença ou ausência de NADPH (250 mmol.L^{-1}). — metabolização da Benziloxiresorufina, — metabolização da Benziloxiresorufina na presença do MI-D ($25 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$); — Metabolização do MI-D ($25 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$); — meio de reação sem substrato; — Meio de reação com MI-D ($25 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$) e sem NADPH.

6.2.4.2 DETERMINAÇÃO DOS PARAMETROS CINÉTICOS K_m E V_{max}

Com o objetivo de estabelecer parâmetros cinéticos para a metabolização do MI-D pelo sistema P450, foram realizados ensaios fluorimétricos em preparação microssomal de hepatócitos de camundongos induzidos com fenobarbital na presença de 2,5 a 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de MI-D e acompanhado o aumento da fluorescência no período de 50 segundos de reação. Foram estimados os valores de K_m e V_{max} utilizando software Excel (Microsoft®), o valor encontrado foi de $V_{max} = 1,5 \pm 0,4$ unidades de fluorescência/segundo e de $K_m = 19,5 \pm 4,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figura 24). Estes resultados confirmam a reação de metabolização do MI-D e indicam que a reação segue cinética de Michaelis-Menten. Se por um lado, não foi possível a investigação de possíveis influências do MI-D na metabolização de marcadores das isoformas CYP1A e CYP2B de P450, os resultados de determinação de parâmetros cinéticos são importantes, pois possibilitam o acompanhamento futuro de ensaios de inibição seletiva para a identificação de isoformas que atuem na metabolização desta droga.

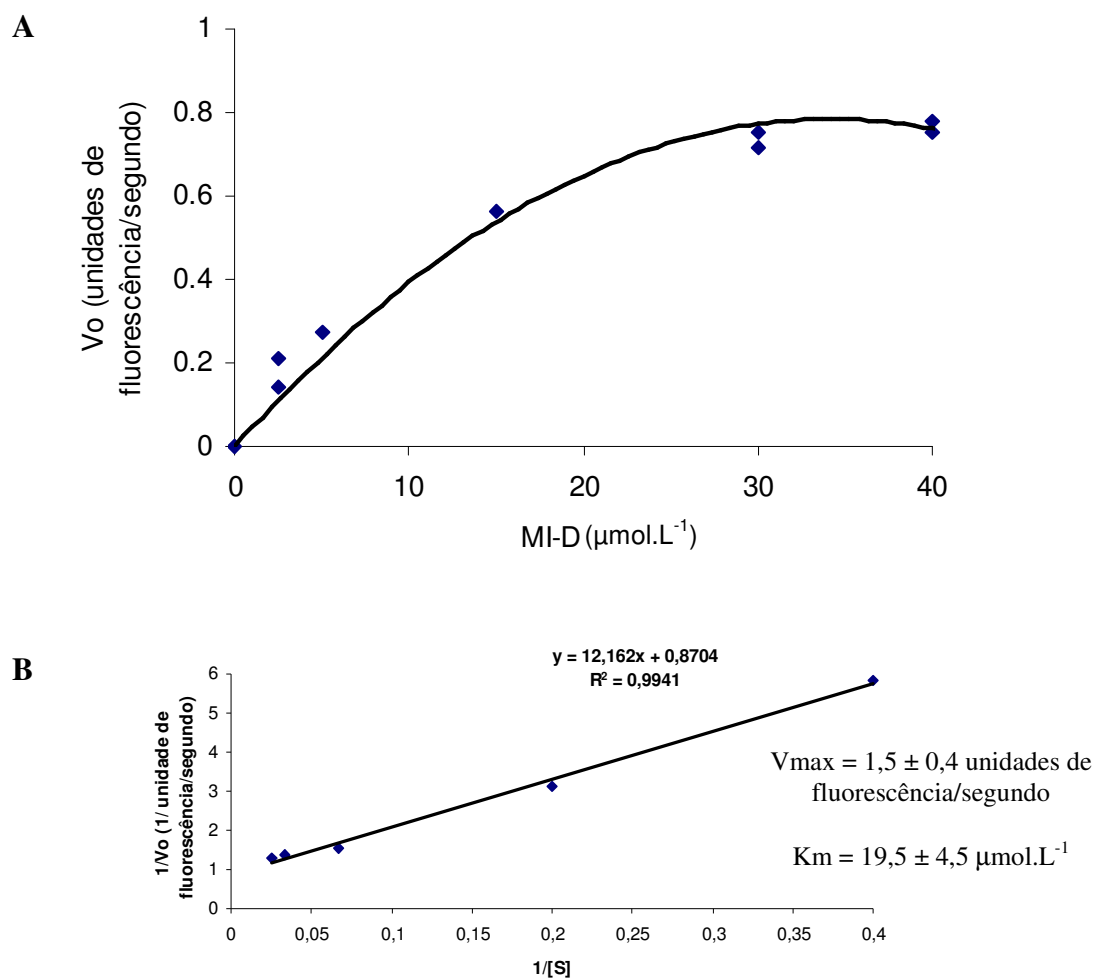


FIGURA 24 - DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS K_m E V_{max}

FONTE: O autor (2008)

Condições de Ensaio: Reação de metabolização do MI-D ($2,5 - 40 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em $100 \mu\text{g/mL}$ de proteína microssomal $0,12\%$ DMSO, 250 mmol.L^{-1} de NADPH em tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 7,4) em volume final de 3 mL. A) Gráfico de cinética enzimática da metabolização microssomal do MI-D com aumento da velocidade de formação de produto fluorescente em função do aumento da concentração do MI-D no meio de reação; B) Gráfico de Lineweaver-Burk utilizado para cálculo de V_{max} e K_m . Os valores de velocidade máxima e K_m correspondem a média e desvio padrão de ensaios realizados em microssomas isolados de três animais diferentes.

6.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE “*IN VIVO*”

6.3.1 ENSAIOS DE DOSE LETAL MÉDIA (DL₅₀)

O valor da DL₅₀ foi determinado a partir de administração do MI-D em DMSO/PBS 50% a 9 grupos de camundongos, dos quais 7 experimentais, nas doses: 50, 100, 200, 250, 300, 400, 500 mg/Kg, e dois grupos controles: DMSO/PBS 50% e PBS (tabela II). Os animais submetidos às diferentes doses de MI-D apresentaram, durante primeira hora após administração da droga, alterações comportamentais como: contrações abdominais, perda da força de apreensão, diminuição da agressividade, ptose palpebral, sedação, catatonia, diminuição da deambulação, rastro do trem posterior e ereção dos pêlos. Alterações fisiológicas como diarreia, diminuição de fezes e diminuição de urina também foram observadas. Os animais submetidos a 500 mg/kg apresentaram alteração de coloração com aparente cianose. Após 6 h, as alterações comportamentais se mantiveram, tornando-se menos intensas para os grupos tratados com 50 e 100 mg/kg, porém foi observada a presença de cianose, também nos grupos de 200, 250, 300 e 400 mg/kg.

Houve agravamento do quadro clínico, com dificuldade motora e secreção ocular, seguido de morte nas doses de 100, 200, 250, 300, 400 e 500 mg/kg ao longo das primeiras 96 h após a aplicação da droga (Tabela II). Os animais do grupo tratado com 50 mg/kg passaram a apresentar comportamento normal após 24 h de tratamento. Nas demais doses, os sobreviventes apresentaram comportamento normal após 72 h de tratamento.

A dose de MI-D em DMSO/PBS 50% identificada como letal para 50% da população em camundongos, determinada através do método de Litchfield & Wilcoxon, (1948) para grupos com número diferentes de indivíduos, foi de 181,2

mg/kg (415 μ mol/kg), apresentando limite de confiança inferior de 146,2 e superior de 225 mg/kg, e coeficiente de correlação de 0,97.

Cardoso et al. (2005), utilizando modelo murino identificou efeito farmacológico do MI-D, demonstrando atividade analgésica e antiinflamatória na dose de 8 mg/kg (18,3 μ mol/kg) e atividade antipirética, na dose de 1 mg/kg (2,3 μ mol/kg). Senff-Ribeiro et al. (2004a), constatou que a dose de 57 μ mol/kg (25 mg/kg) de MI-D em camundongo, resulta na inibição do crescimento tumoral de melanoma B16-F10 em 77 %. Portanto, a dose correspondente a DL50 (181,2 mg/kg) é 22,6 vezes maior que a dose efetiva para atividade antiinflamatória e analgésica, 181 vezes maior que a dose efetiva para atividade antipirética e sete vezes maior que a dose efetiva para atividade antimelanoma para o modelo adotado.

TABELA II– NÚMERO DE MORTES DE CAMUNDONGOS APÓS TRATAMENTO COM MI-D

Grupo (mg/kg)	Número de indivíduos	Número de mortes					% mortes
		24 h	48 h	72 h	96 h	Total	
500	6	04	01	01	-	06	100
400	10	08	-	01	-	09	90
300	10	05	01	02	-	08	80
250	07	-	04	-	01	5	71
200	10	03	-	04	-	08	80
100	13	-	-	-	01	01	7,6
50	07	-	-	-	-	-	0
Controle DMSO/PBS	11	-	-	-	-	-	0
Controle PBS	11	-	-	-	-	-	0

FONTE: O autor (2008)

6.3.2 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

Os animais que sobreviveram ao tratamento com as diferentes doses de MI-D em DMSO foram eutanasiados (com éter) após 14 dias do início do ensaio de determinação de DL_{50} . A cavidade abdominal foi aberta e feita observação macroscópica, sendo possível visualizar regiões de acúmulo de MI-D nos tecidos devido à cor laranja do produto. Estes acúmulos foram observados em todos os grupos de animais tratados com MI-D e sua frequência e intensidade foram dose dependentes. Outra observação importante foi o aparecimento de focos inflamatórios no peritônio levando a união das membranas serosas de órgãos como fígado, estômago, baço, pâncreas e intestino. Esta condição tornou-se evidente em animais tratados com doses acima de 250 mg/kg de MI-D. Amostras destes órgãos foram processadas para análise histopatológica, juntamente com fígado, pâncreas e rim dos animais tratados e controles.

As análises histológicas de fígados de camundongos após o período de 14 dias de teste apresentaram padrões histológicos característicos em animais controles PBS e DMSO/PBS, sendo constituído de hepatócitos grandes arranjados em fileiras no plano de corte, as quais aparecem separadas por sinusóides tortuosos. Os hepatócitos exibem pequena variação no tamanho celular, porém apresentam variação nuclear em relação a tamanho e número, sendo freqüentes os hepatócitos binucleares (Figura 25A-L). Estas variações nucleares podem ser encontradas em fígados sadios e tendem a aumentar de freqüência com o envelhecimento (COTRAN *et al.*, 1996).

Houve aparente diminuição do tamanho nuclear e celular de hepatócitos de animais tratados, com exceção do indivíduo tratado com 400 mg/kg, que apresentou hepatócitos com tamanho bastante semelhante ao encontrado nos animais controles. Foram observados hepatócitos com acúmulo eosinofílico em indivíduo

tratado com 100 mg/kg de MI-D, porém esta condição não se repetiu nos demais grupos (Figura 25 E-K).

Em casos de grandes lesões parenquimatosas, a reparação não pode ocorrer exclusivamente pela regeneração das células parenquimatosas, ocorrendo substituição destas não regeneradas por células do estroma (tecido conjuntivo), formando regiões de fibrose (COTRAN *et al.*, 1996). Não foram encontradas regiões de fibrose hepática nos animais analisados indicando que apesar de ocorrerem alterações relacionadas às altas doses de MI-D utilizadas no tratamento, a capacidade de regeneração hepática manteve a estrutura do órgão. Exceto, nas regiões onde se formaram granulomas.

Não foram encontradas alterações em pâncreas (Figura 26) e rins (Figura 27) dos indivíduos tratados. Os órgãos dos animais tratados apresentaram padrões histológicos semelhantes aos observados nos indivíduos controles.

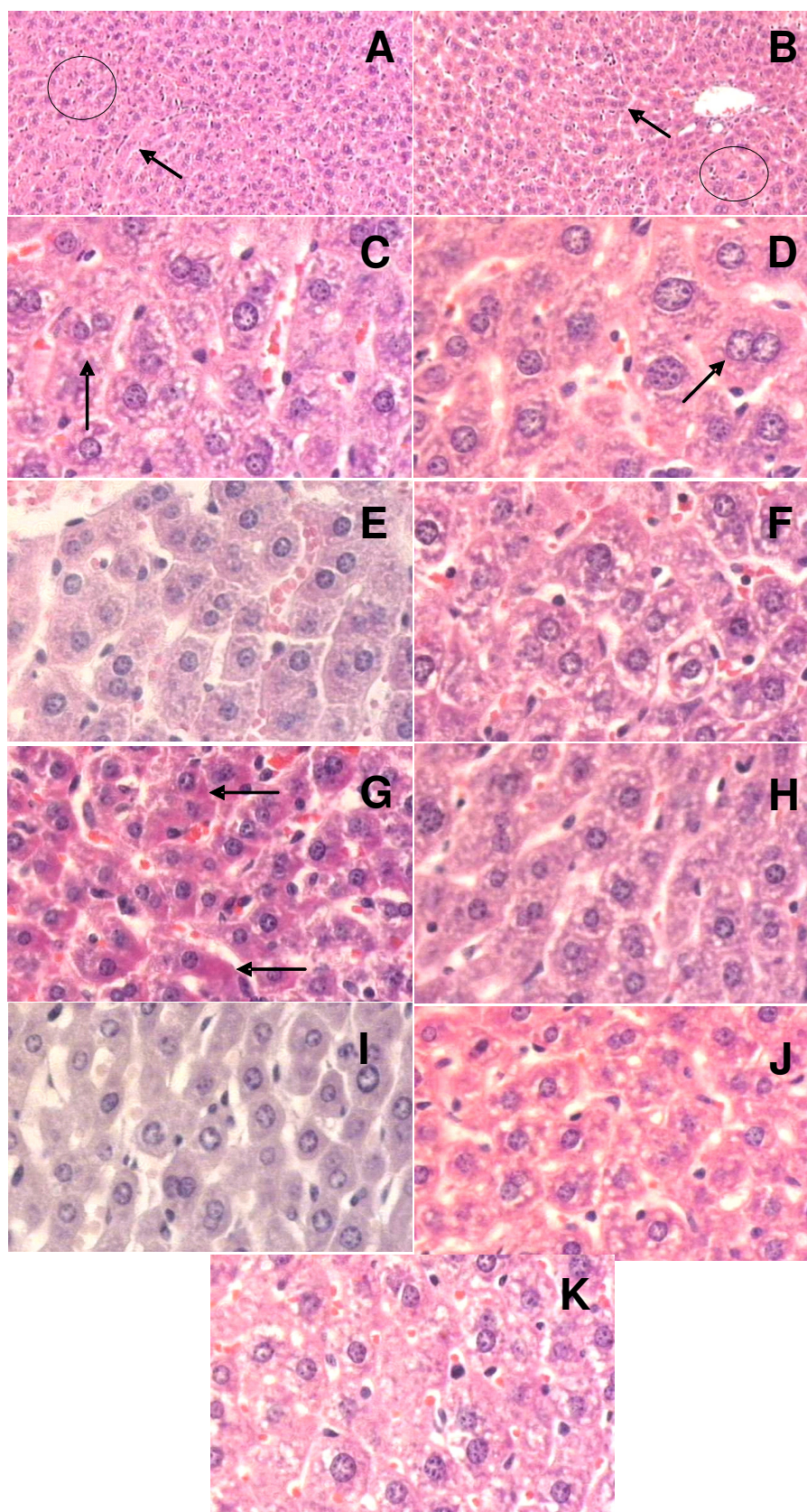


FIGURA 25 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE FÍGADO DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM MI-D EM ENSAIO DE DL50
FONTE: O autor (2008)

NOTA: O ensaio de determinação da DL_{50} foi realizado utilizando-se 9 grupos de camundongos, sendo: 7 grupos experimentais (50, 100, 200, 250, 300, 400 e 500 mg/kg de MI-D por peso do animal), 1 grupo controle tratado com DMSO/PBS 50% e 1 grupo controle tratado com PBS. A aplicação da droga foi por via intraperitoneal e os animais sobreviventes foram eutanasiados após 14 dias, sendo realizada a fixação e processamento histológico. A) visão panorâmica de fígado de animal controle PBS, demonstrando hepatócito em destaque circular e sinusóides indicados por setas (aumento 100x). B) visão panorâmica de fígado controle DMSO/PBS, 50%, demonstrando hepatócito em destaque circular e sinusóides indicados por setas (setas) (100x). C) ampliação hepatócitos de animal controle PBS, indicação de célula binucleada (seta) (400X); D) ampliação fígado controle DMSO/PBS 50%, com célula binucleada indicada por seta (400x); E) hepatócitos de animal tratado 50 mg/kg (400x); F e G) hepatócitos de animal tratado 100 mg/kg (400x). Em G ocorre acúmulo eosinofílico no citoplasma das células (seta); H) hepatócitos de animal tratado 200 mg/kg (400x); I) hepatócitos de animal tratado 250 mg/kg (400x); J) hepatócitos de animal tratado 300 mg/kg (400x); K) hepatócitos de animal tratado 400 mg/kg (400x). coloração H.E.

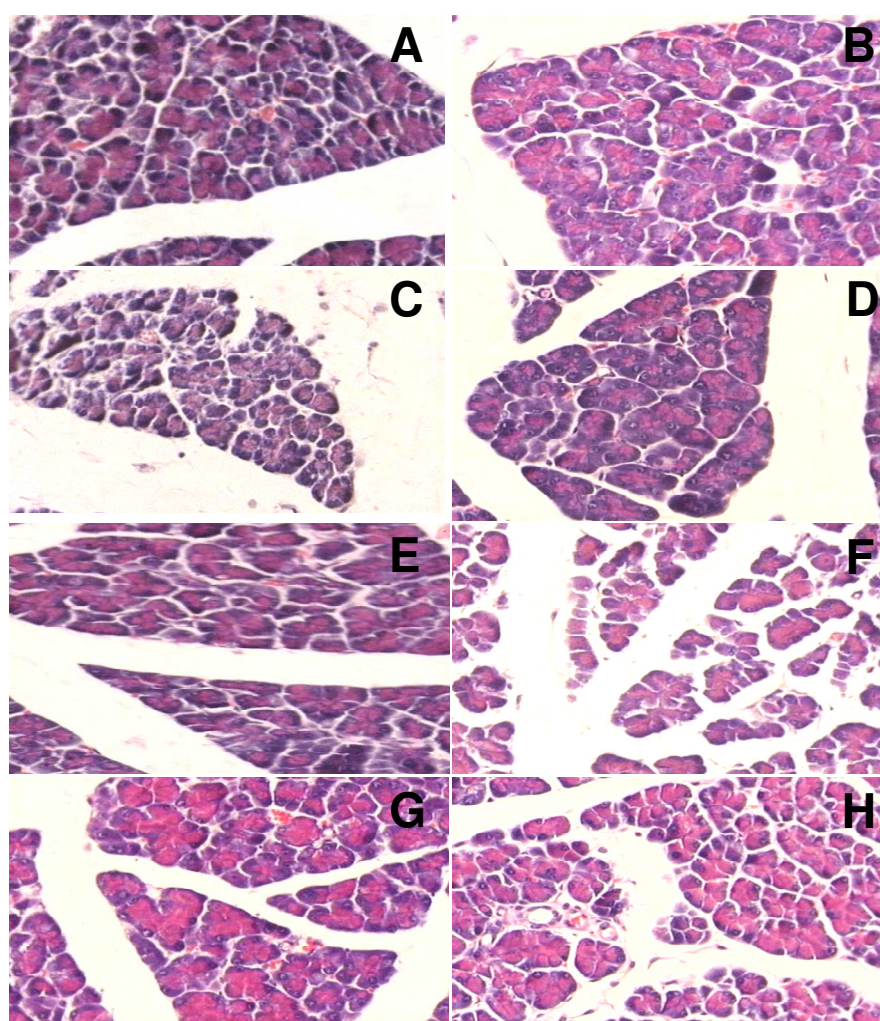


FIGURA 26 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE PÂNCREAS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM MI-D EM ENSAIO DE DL_{50} .

FONTE: O autor (2008)

NOTA: O ensaio de determinação da DL_{50} foi realizado utilizando-se 9 grupos de camundongos, sendo: 7 grupos experimentais (50, 100, 200, 250, 300, 400 e 500 mg/kg de MI-D por peso do animal), 1 grupo controle tratado com DMSO/PBS 50% e 1 grupo controle tratado com PBS. A aplicação da droga foi por via intraperitoneal e os animais sobreviventes foram eutanasiados após 14 dias, sendo realizada a fixação e processamento histológico do pâncreas. Visão de ácinos pancreáticos em aumento de 200x e coloração por hematoxilina e eosina. A) controle PBS; B)

Controle DMSO/PBS 50%; C) 50 mg/kg de MI-D; D) 100 mg/kg; E) 200 mg/kg; F) 250 mg/kg; G) 300 mg/kg; H) 400 mg/kg.

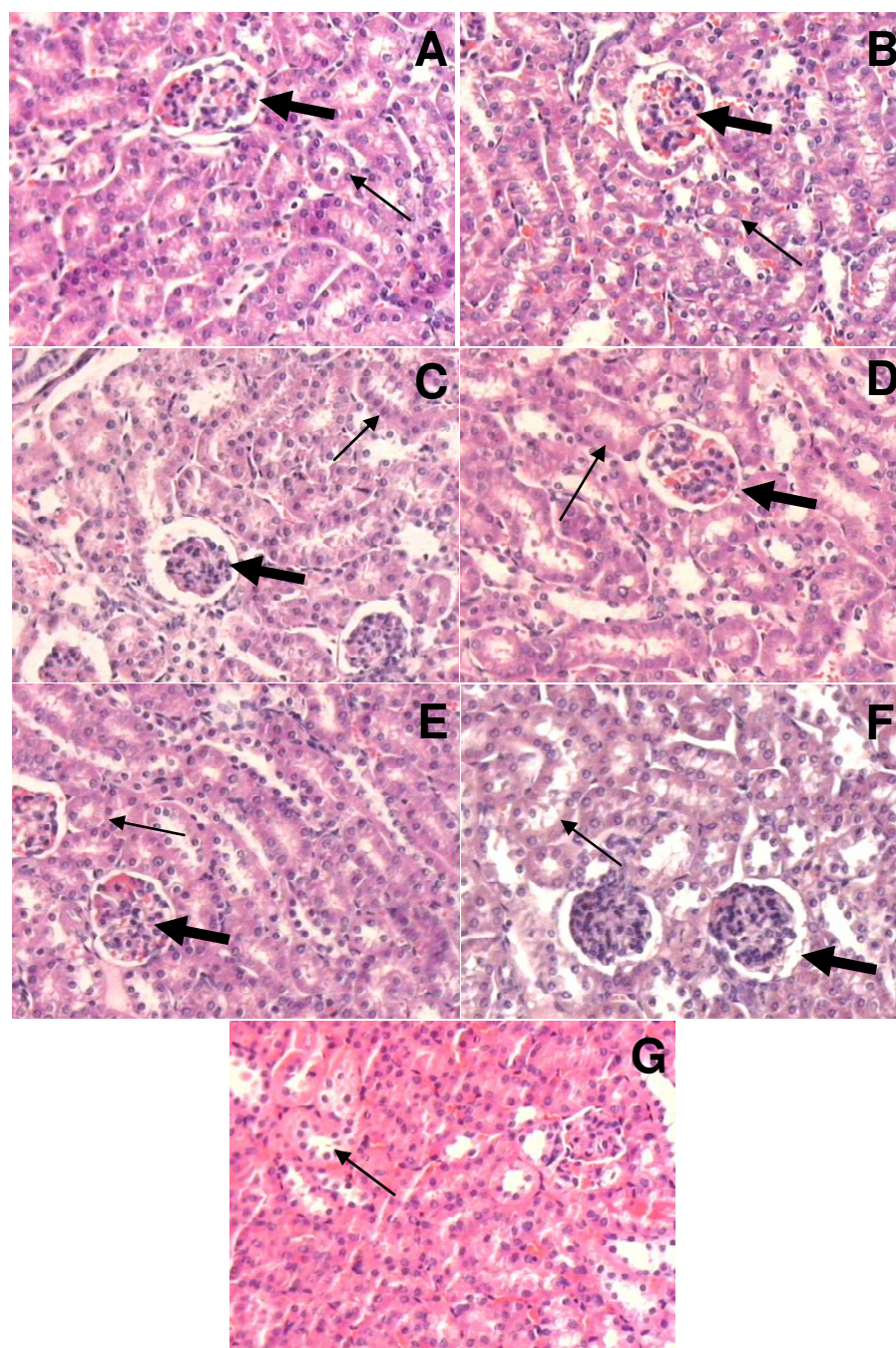


FIGURA 27 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE RINS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM MI-D EM ENSAIO DE DL₅₀

FONTE: O autor (2008)

NOTA: O ensaio de determinação da DL₅₀ foi realizado utilizando-se 9 grupos de camundongos, sendo: 7 grupos experimentais (50, 100, 200, 250, 300, 400 e 500 mg/kg de MI-D por peso do animal), 1 grupo controle tratado com DMSO/PBS 50% e 1 grupo controle tratado com PBS. A aplicação da droga foi por via intraperitoneal e os animais sobreviventes foram eutanasiados após 14 dias, sendo realizada a fixação e processamento histológico dos rins. Visão de região do córtex renal apresentando túbulos contorcidos e corpúsculos glomerulares indicados por setas. Aumento de 200x e coloração por hematoxilina e eosina. A) controle PBS; B) Controle DMSO/PBS 50%; C) 50 mg/kg de MI-D; D) 100 mg/kg; E) 200 mg/kg; F) 250 mg/kg; G) 300 mg/kg.

Amostras de regiões apresentando fusão de membrana serosa de diferentes órgãos e regiões com acúmulo de MI-D foram analisadas sendo possível identificar grande infiltração leucocitária e formação de granulomas, com destruição de tecido de alguns órgãos (Figura 28). Alguns exemplos destas condições foram: 1) acúmulo de MI-D com infiltração leucocitária na membrana serosa que recobre o pâncreas em indivíduo tratado com 50 mg/kg de MI-D (Figura 28A); 2) fusão da membrana serosa que recobre pâncreas, estômago e baço em indivíduo tratado com 250 mg/kg de MI-D (Figura 28B), 3) fusão de serosa, com destruição de parte da camada muscular e acúmulo de MI-D com formação de granuloma entre as alças intestinais de indivíduo tratado com 300 mg/kg (Figura 28C), 4) fusão de parede de intestino, pâncreas e fígado e formação de granuloma no interior de parênquima hepático em indivíduos tratados com 400 mg/kg (Figura 28D). Deve-se salientar que os animais analisados são sobreviventes de ensaio de DL_{50} onde foram administradas altas doses do composto mesoiônico MI-D e nas quais foram observadas altas taxas de morte. Considerando que uma peritonite devido a insolubilidade do MI-D poderia estar envolvida na determinação da DL_{50} , torna-se necessário a busca de veículos mais eficientes como veículo desta droga.

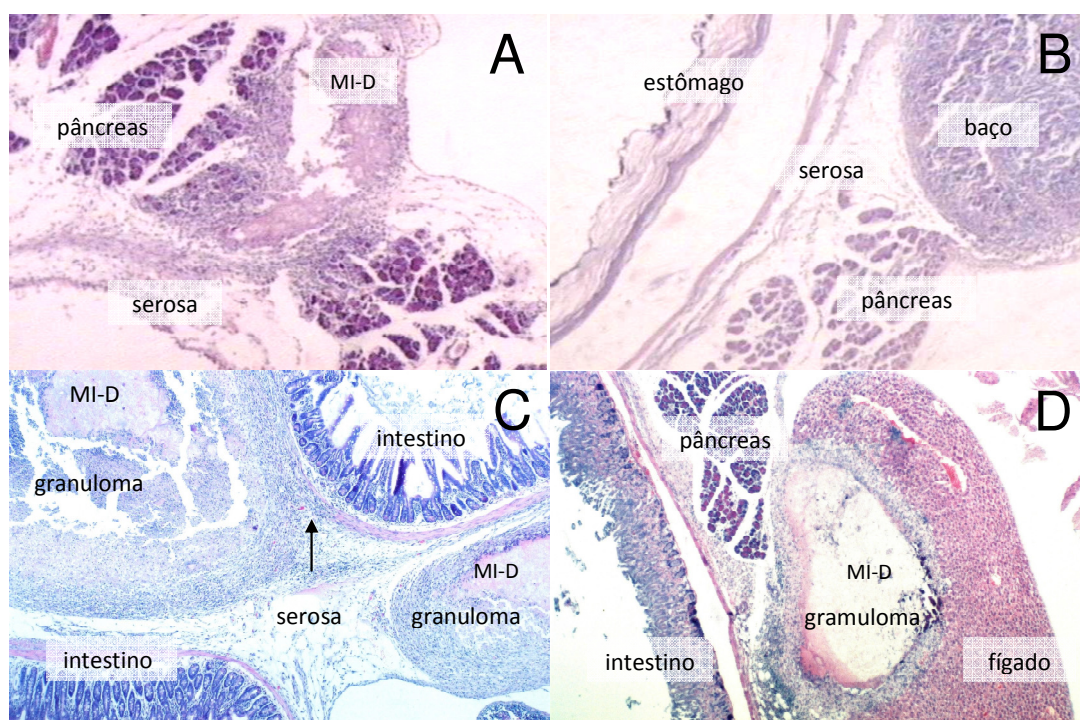


FIGURA 28 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE ÓRGÃOS DA CAVIDADE PERITONIAL DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM MI-D EM ENSAIO DE DL50

FONTE: O autor (2008)

NOTA: O ensaio de determinação da DL₅₀ foi realizado utilizando-se 9 grupos de camundongos, sendo: 7 grupos experimentais (50, 100, 200, 250, 300, 400 e 500 mg/kg de MI-D por peso do animal), 1 grupo controle tratado com DMSO/PBS 50% e 1 grupo controle tratado com PBS. A aplicação da droga foi por via intraperitoneal e os animais sobreviventes foram eutanasiados após 14 dias, sendo realizada a fixação e processamento histológico de regiões de acúmulos de MI-D e fusão de parede de órgãos. A) região de acúmulo de MI-D com processo de infiltração leucocitária na região de membrana serosa que recobre o pâncreas em animal tratado com 50 mg/kg de MI-D; B) fusão da membrana serosa que recobre de pâncreas, estômago e baço em indivíduo tratado com 250 mg/kg de MI-D C) fusão de serosa, com destruição de parte da camada muscular (seta) e acúmulo de MI-D com formação de granuloma entre as alças intestinais de indivíduo tratado com 300 mg/kg; D) fusão de parede de intestino, pâncreas e fígado e formação de granuloma no interior de parênquima hepático em indivíduos tratados com 400 mg/kg. Aumento de 40x e coloração hematoxilina e eosina.

O estudo da toxicidade de uma droga é um aspecto essencial para a sua aceitação, portanto, foi um dos objetivos deste estudo. Sabe-se que a toxicidade é uma das maiores preocupações quando se trata de um agente com atividade antitumoral devido ao reconhecimento da estreita margem terapêutica desses compostos e sua proximidade com uma dose de toxicidade inaceitável (CHATELUT et al., 2003). Avaliações toxicológicas agudas são realizadas através de identificação da dose letal média – DL₅₀. A prática experimental deste procedimento em análises de compostos químicos é bastante criticada por questões éticas, científicas e econômicas, porém é de consenso que a determinação da DL₅₀ deve ser reduzida

através de estimativas utilizando um número reduzido de animais, mas nunca eliminada totalmente (ZBINDEN e FLURY-ROVERSI, 1981). Este procedimento é utilizado como uma importante ferramenta em diferentes estudos sobre efeitos toxicológicos de drogas (JAGETIA *et al.*, 2002; MAYER *et al.*, 1990), sendo de grande auxílio como parâmetro de comparação entre a eficiência e toxicidade de diferentes drogas. A avaliação da toxicidade aguda do MI-D foi realizada através da estimativa de DL_{50} em camundongos por administração via intraperitoneal, sendo encontrada a dose 181,2 mg/kg. Cardoso *et al.* (2004), utilizando modelo murino identificou efeito farmacológico do MI-D, demonstrando atividade analgésica e antiinflamatória na dose de 8 mg/kg e atividade antipirética, na dose de 1 mg/kg. Senff-Ribeiro *et al.* (2004a), constatou que a dose de 25 mg/kg de MI-D em camundongo, resulta na inibição do crescimento tumoral de melanoma B16-F10. Portanto a dose correspondente a DL_{50} (181,2 mg/kg) é 22 vezes maior que a dose efetiva para atividade antiinflamatório e analgésico, 181 vezes maior que a dose efetiva para atividade antipirética e sete vezes maior que a dose efetiva para atividade antimelanoma para o modelo adotado. Considerando que o principal feito morfológico identificado após 14 dias da administração da droga foi a adesão abdominal indicando uma peritonite, a qual pode estar relacionada ao acúmulo do MI-D na cavidade abdominal devido a sua baixa solubilidade ao veículo utilizado, a busca de novos veículos pode colaborar para reduzir estes efeitos tóxicos por aumento de solubilidade da droga e consequentemente aumentar a dose estimada como DL_{50} . Por outro lado, este possível aumento de solubilidade levaria a um consequente aumento de absorção do MI-D, o que poderia causar um aumento dos efeitos tóxicos da droga, e portanto, uma diminuição da dose estimada como DL_{50} . Senff-Ribeiro *et al.* (2003) compararam o efeito antitumoral do MI-D às drogas Fotemustina e Dacarbazina em camundongo utilizando a concentração de 57 $\mu\text{mol/kg}$ para os três compostos. O MI-D apresentou uma potente atividade antitumoral, mais eficientes que as drogas utilizadas na quimioterapia contra melanoma. A droga fotemustina apresenta estimativa de DL_{50} em camundongo de

50 mg/kg (ROSSI *et al.*, 2006), portanto uma maior proximidade entre o efeito terapêutico e o efeito tóxico letal. Desta forma, os novos avanços indicam que há grande perspectiva da utilização do MI-D em terapias antitumorais. Contudo, são necessários novos estudos a serem realizados para comprovar a eficiência do MI-D como uma droga antitumoral.

7. CONCLUSÕES

As células de melanoma murino B16-F10 e melanoma humano MEWO, MEL-85 e SK-MEL são resistentes ao tratamento com MI-D em concentração de 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ por duas horas.

As células MEL-85 e B16-F10 são produtoras de PGE_2 .

O MI-D inibe a produção de PGE_2 em células de melanoma humano MEWO, MEL-85 e SK-MEL.

O MI-D estimula a produção de PGE_2 em células B16-F10.

As células SK-MEL e B16-F10 apresentam expressão de COX-1 e COX-2 e esta expressão não é influenciada pelo MI-D.

O MI-D é metabolizado pelo sistema P450 *in vitro*. Sendo que um dos metabólitos foi denominado como MET.

O MI-D é metabolizado pelo sistema P450 *in vivo*, sendo a urina uma das vias de excreção.

Análise do metabólito MET por espectrometria de massas indica que o composto apresenta 4 grupos hidroxila adicionais comparado ao MI-D, porém não foi possível a determinação a exata posição de cada hidroxila.

A dose de MI-D em DMSO/PBS 50% identificada como letal para 50% da população em camundongos foi de 181,2 mg/kg.

O MI-D causa adesão de serosa e formação de grânulomas na serosa e no interior do parênquima dos órgãos da cavidade abdominal quando administrado via intra-peritoneal em DMSO/PBS 50%.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, S.I.; SANDERSON, I.R.; FITZGERALD, R.C. Effect of inflammation on cyclooxygenase (COX)-2 expression in benign and malignant oesophageal cells. **Carcinogenesis**, Oxford, v.26, n. 9, p.1627-1633, 2005.

ACCO, A. Transporte, transformação, distribuição e efeitos metabólicos do propofol em fígado de rato. Maringá, 2003, Dissertação (Doutor em Biologia Celular) - Universidade Estadual de Maringá.

ALI, M. A.; CHOY, H.; HABIBY, A. A.; SAHA, D. SNS-032 Prevents Tumor Cell-Induced Angiogenesis By Inhibiting Vascular Endothelial Growth Factor1. **Neoplasia**, New York, v.9, n.5, p.370 – 381, 2007.

AMANO, H.; HAYASHI, I.; ENDO, H.; KITASATO, H.; YAMASHINA, S.; MARUYAMA, T.; KOBAYASHI, M.; SATOH, K.; NARITA, M.; SUGIMOTO, Y.; MURATA, T.; YOSHIMURA, H.; NARUMIYA, S.; MAJITA, M. Host Prostaglandin E₂-EP3 Signaling Regulates Tumor-Associated Angiogenesis and Tumor Growth. **J. Exp. Med.**, New York, v.197, n.2, p.221-232, 2003.

AN, K.P.; ATHAR, M.; TANG, X.; KATYAR, S.K.; RUSSO, J.; BEECH, J.; ASZTERBAUM, M.; KOPELOVICH, L.; EPSTEIN JR., E.H.; MUKHTAR, H.; BICKERS, D.R. Cyclooxygenase-2 Expression in Murine and Human Nonmelanoma Skin Cancers: Implications for Therapeutic Approaches. **Photochem Photobiol.**, Oxford, v.76, n.1, p.80, 2002.

ATSUMI, G.; MURAKAMI, M.; KOJIMA, K.; HADANO, A.; TAJUMA, M.; KUDO, I. Distinct roles of two intracellular phospholipase A₂ in fatty acid release in cell death pathway. **J. Biol. Chem.**, Bethesda. v. 275, n. 24, p. 18248-18258, 2000.

AVRIL, M.F.; AAMDAL, S.; GROB, J.J.; HAUSCHILD, A.; MOHR, P.BONERANDI, .; J.J.; WEICHENTHAL, M.; NEUBER, K.; BIEBER, T.; GILDE, K.; GUILLEM PORTA, V.; FRA, J.; BONNETERRE, J.; SAÏAG, P.; KAMANABROU, D.; PEHAMBERGER, H.; SUFLIARSKY, J.; GONZALEZ LARRIBA, J.L.; SCHERRER, A.; MENU, Y. Fotemustine Compared With Dacarbazine in Patients With Disseminated Malignant Melanoma: A Phase III Study. **J Clin Oncol.**, Philadelphia, v.22, n.6, p.1118-1125, 2004.

BAKER, W.; OLLIS, W. D. Meso-ionic compounds. **Chem. Ind.**, London, v.16, p.910-911, 1955.

BALABAN, A.T.; ONICIU, D. C.; KATRITZKY, A. R. Aromaticity as a Cornerstone of Heterocyclic Chemistry. **Chem. Rev.**, v. 104, n. 5, p.2777-2812, 2004.

BERKOWITZ, B. A.; KATZUNG, B. G. Avaliação Básica e Clínica de Novas Drogas. In: Katzung, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. Sexta edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1998. p. 48-56.

BHATTACHARYYA, D. K.; LECOMTE, M.; RIEKE, C. J. R.; GARAVITO, M.; SMITH, W. L. Involvement of Arginine 120, Glutamate 524, and Tyrosine 355 in the Binding of Arachidonate and 2-Phenylpropionic Acid Inhibitors to the Cyclooxygenase Active Site of Ovine Prostaglandin Endoperoxide H Synthase-1. **J. Biol. Chem.**, Bethesda. v.271, n.4, p.2179–2184, 1996.

BI, X.; MENG, Z.; CHEN, H.; ZHU, X.; DOU, G. *In vivo* and *in vitro* metabolism of lefucosib in rats, **J Pharm Biomed Anal.**, Oxford, v.48, n.134–139, 2008.

BLACK, S. D.; MARTIN, S. T. Membrane Topology of Liver Microsomal Cytochrome P450 2B4 Determined via Monoclonal Antibodies Directed to the Halt-Transfer Signal. **Biochemistry**, Washington, v.33, p.6945-6951, 1994.

BOGAARDS, J. J.; BERTRAND, M.; JACKSON, P.; OUDSHOORN, M. J.; WEAVERS, R. J.; BLADEREN, P. J.; WALTHER, B. Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man. **Xenobiotica**, London, v. 30, n. 12, p.1131-1152. 2000.

BOS, C. L., RICHEL, D. J. ; RITSEMA, T. ; PEPPELENBOSCH, M. P., VERSTEEG, H. H. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. **Inf. J. Biochem. Cell Biol.**, Exeter, v. 36, p.1187-1205. 2004.

BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C. L. Técnicas de centrifugação e de fracionamento celular. In: Bracht, A.; Ishii-Iwamoto, E. L. **Métodos de Laboratório em Bioquímica**. São Paulo. Editora Manole Ltda. 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, New York, v.72, p.248-254, 1976.

BRASIL, Resolução 251/97. Conselho Nacional de Saúde, Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/docs/Resolucoes/Reso251.doc>. Acesso: em 10 de setembro de 2004.

BRASIL, Boas Práticas Clínicas. Resolução Nº129/96. Grupo Mercado Comum (MERCOSUL) Disponível em: <http://www.mercosur.org.uy/portugues/snor/normativa/LRES965.HTM>. Acesso em: 10 de setembro de 2004.

BRAUZE, D. Comparison of the induction of a 4S β -naphthoflavone-binding protein, cytochrome P450 1A1 and NAD(P)H: quinine oxidoreductase in β -naphthoflavone-treated rats. **Toxicol Lett.**, Amsterdam, v.152, p.111-116, 2004.

BURKE, M. D.; THOMPSON, S.; ELCOMBE, C. R.; HALPERT, J.; HAAPARANTA, T.; MAYER, R. T. Ethoxy-, Pentoxy- and Benzyloxyphenoxazones and homologues: As series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v.34, n.18. p.3337-3345. 1985.

CADENA, S.M.S.C.; CARNIERI, E.G.S.; ECHEVARRIA, A.; OLIVEIRA, M.B.M. Effect of MI-D, a new mesoionic compound, on energy-linked functions of rat liver mitochondria. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.440, p.46-50, 1998.

CADENA, S.M.S.C.; CARNIERI, E.G.S.; ECHEVARRIA, A.; OLIVEIRA, M.B.M. Interference of MI-D, a new mesoionic compound, on artificial and native membranes. **Cell Biochem. Funct.**, Chichester, v.20, p.31-37, 2002.

CARDOSO, J.C.; CADENA, S.M.S.C.; ZAMPRONIO, A.; ARRUDA, A.M.S.; CARNIERI, E.G.S.; ECHEVARRIA, A.; CONSTANTIN, J.; BRACHT, A. OLIVEIRA, M.B.O. Effects of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on acute inflammatory response. **Drug Develop Res**, New York, v.61, n.4, p.207-217, 2004.

CHANDRASEKHARAN, N.V.; SIMMONS, D. L. The cyclooxygenases. **Genome Biology**, London, v.5, n.241, 2004.

CHANG, Y. E.; JAKOBI, R.; MCGINTY, A.; FOSCHI, M.; DUNN, M.J.; SOROKIN, A. Cyclooxygenase 2 promotes cell survival by stimulation if dynein light chain expression and inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity. **Mol Cell Biol.**, Washington, v.20, n.22, p.8571-8579, 2000.

CHATELUT, E.; DELORD, J.P.; CANAL, P. Toxicidade patterns of cytotoxic drugs. **Invest. New Drugs**, Boston, v.21, p.141-148, 2003.

CHIRUVELLA, K.K.; KARI V.; CHOUDHARY, B.; NAMBIAR, M.; GHANTA, R. G.; RAGHAVAN, S. C. Methyl angolensate, a natural tetranortriterpenoid induces intrinsic apoptotic pathway in leukemic cells. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.582, p.4066–4076, 2008.

CLAVEAU, D.; SIRINYAN, M.; GUAY, J.; GORDON, R.; CHAN, C.; BUREAU, Y. RIENDEAU, D.; MANCINI, J. A.; Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 is a Major Terminal Synthase that is Selectively Up-Regulated During Cyclooxygenase-2-Dependent Prostaglandin E₂ Production in the rat Adjuvant-Induced Arthritis Model. **J. Immunol.**; Bethesda, v.170, p. 4738-4744, 2003.

COON, M.J.; DING, X.; PERNECKY, S. J.; VAZ, A.D.N. Cytochrome P450: progress and predictions. **FASEB J.**, Bethesda, v.6, 1992

COON, M. J. CYTOCHROME P450: Nature's Most Versatile. Biological Catalyst. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, Palo Alto, v.45, p.1-25, 2005.

COPELAND, R. A.; WILLIAMS, J. M.; GIANNARAS, J.; NURBERG, M. C.; PINTO, D.; PICK, S.; TRZASKOS, J. M. Mechanism of Selective Inhibition of the Inducible Isoform of Prostaglandin G/H Synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v.91, p11202-11206, 1994.

CORREIA, M. A. Biotransformação de Drogas. In: Katzung, B. G. **Farmacologia Básica e clínica**. Sexta edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1995. p. 38-47.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L.; SCHOEN, F.J. Inflamação e Reparação. In: _____, **Patologia Estrutural e Funcional**. Quinta edição. Guanabara Koogan. p. 45-83. 1996.

CZEKAJ, P. Phenobarbital-induced expression of cytochrome P450 genes. **Acta Biochim Pol.**, Warszawa. v.47, n.4, p.1093–1105, 2000.

DAIYASU H, TOH H. Molecular evolution of the myeloperoxidase family. **J. Mol. Evol.**, New York, v. 51, p. 433-445. 2000.

DANDEKAR, D.S.; LOKESHAWAR, B.L. Inhibition of Cyclooxygenase (COX)-2 Expression by Tet-Inducible COX-2 Antisense cDNA in Hormone-Refractory Prostate Cancer Significantly Slows Tumor Growth and Improves Efficacy of Chemotherapeutic Drugs. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v.10, p.8047-8047, 2004.

DENISOV, I. G.; MAKRIS, T. M.; SLIGAR, S. G.; SCHLICHTING, I. Structure and Chemistry of Cytochrome P450. **Chem. Rev.**, Washington, v.105, p.2253-2277, 2005.

DENKERT, C.; KÖBEL, M.; BERGER, S.; SIEGERT, A.; LECLERE, A.; TREFZER, U.; HAUPTMANN, S. Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma. **Cancer Res.**, Baltimore, v.61, p.303-308, 2001.

DING, X.; HENNIG, R.; ADRIAN, T.E. Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer. **Molecular Cancer.**, London, v.2, n.10, 2003.

DOS SANTOS, A. C. S.; ECHEVARRIA, A. Eletronic effects on ^{13}C NMR chemical shifts of substituted 1, 3, 4-thiadiazolium salts. **Magn. Reson. Chem.**, Chichester, v.39, p.182-186, 2001.

DUFF, P. P. M.; STAPLETON, J.R.; MESTRE, S.; MADDALI, G. P.; SMYTH, Z.; YAN, A. T.; FREEMAN, J. M.; DALY. Cyclooxygenase-2 Inhibition Improves Macrophage Function in Melanoma and Increases the Antineoplastic Activity of Interferon γ . **Ann. Surg. Oncol.**, New York, v.10, n.3, p. 305-313, 2003.

DUNKLEY, C. S.; THOMAN, C. J. Synthesis and biological Evaluation of a Novel Phenyl Substituted Sydnone Series as Potencial Antitumor Agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, New York, v. 13, p. 2899-2901. 2003.

EIGENTLER, T. K.; CAROLI, U. M.; RADNY, P. GARBE, C. Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials. **Lancet Oncol.**, London, v.4, p.748-759, 2003.

ERICKSON, B.A ; LONGO, W.E; PANESAR, N.; MAZUSKI, J.E; KAMINSKI, D.L. The Effect of Selective Cyclooxygenase Inhibitors on Intestinal Epithelial Cell Mitogenesis¹. **J. Surg. Res.**, New York, v. 81. p. 101–107. 1999.

ERVE, J.C. L.; VASHISHTHA, S.C.; OJEWOYE, O.; ADEDOYIN, A.; ESPINA, R.; DEMAIO, W.; TALAAT, R.E. Metabolism of prazosin in rat and characterization of metabolites in plasma, urine, faeces, brain and bile using liquid

chromatography/mass spectrometry (LC/MS). **Xenobiotica**, London, v.38, n.5, p.540-558, 2008.

FOEGH, M.L.; RAMWELL, P. Os Eicosanóides: Prostaglandinas, Tromboxanos, Leucotrienos e Compostos Relacionados. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**. Nona edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2006. p.252-263.

FOULKES, W.D.; FLANDERS, T. Y.; POLLOCK, P. M.; HAYWARD, N. K. The CDKN2A (p16) Gene and Human Cancer, **Mol Med.**, Baltimore, v.3, p.5-20, 1997.

FRYE, R. F. Probe Drugs for Measuring P450 Variability. **Mol. Interventions**. Bethesda, v.4, n.3, p.157-162, 2004.

GENTER, M.B.; CLAY C. D.; DALTON, T. P.; DONG, H.; NEBERT, D. W.; SHERTZER, H.G. Comparison of mouse hepatic mitochondrial versus microsomal cytochromes P450 following TCDD treatment. **Biochem Biophys Res Commun.**, Orlando, v.342, p.1375–1381, 2006.

GIERSE, J. K.; MCDONALD, J. J.; HAUSER, S.D.; RANGWALA, S.H.; KOBOLDT, C. M.; SEIBERT, K.; A Single Amino Acid Difference between Cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2) Reverses the Selectivity of COX-2 Specific Inhibitors. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 271, n.26, p.15810–15814, 1996.

GIJÓN, M. A.; LESLIE, C.C. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. **J. Leukoc. Biol.**, New York, v. 65, p.330-336, 1999.

GLENNON, R.; GAINES, J. J.; ROGERS, M. E. Benz-Fused Mesoionic Xanthine Analogues as Inhibitors of Cyclic-AMP Phosphodiesterase. **J. Med. Chem.**, Washington, v.24, n.6, p.766-769. 1981.

GRAB, L.A.; SWANSON, B.A.; MONTELLANO, P.O. Cytochrome P-450 inactivation by 3-alkylsydnones. Mechanistic implications of N-alkyl and N-alkenyl Heme adduct formation. **Biochemistry**, Washington, v. 27, p. 4805-4814, 1988.

GRYNBERG, N.; SANTOS, A.C.; ECHEVARRIA, A. Synthesis and *in vivo* antitumor activity of new heterocyclic derivatives of the 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide class. **Anticancer Drugs**, Oxford, v. 8, p.88-91, 1997.

GRYNBERG, N.; GOMES, R.; SHINZATO, T.; ECHEVARRIA, A.; MILLER, J. Some New Ary-Sydnones: Effects on Murine Tumours. **Anticancer Res**. Kapandriti, v.12, p.1025-1028. 1992.

GUENGERICH, F. P. Roles of Cytochrome P-450 Enzymes in Chemical Carcinogenesis and Cancer Chemotherapy. **Cancer Res.**, Baltimore, v.48, p.2946-2954, 1988.

HAMILTON, L. C.; VOJNOVIC, I.; WARNER, T. D. A771726, the active metabolite of leflunomide, directly inhibits the activity of cyclo-oxygenase-2 in vitro and in vivo in a substrate-sensitive manner. **Br. J. Pharmacol.**, London, v.127, p.1589 – 1596, 1999.

HAYWARD, N. K. Genetics of melanoma predisposition. **Oncogene**, London, v.22, p.3053-3062, 2003.

HARVEY, D. J. Absorption, distribution, and biotransformation of the Cannabinoids. In: Nahas, G.G; SUTIN, K.M.S; HARVEY, D.J.; AGURELL, S. **Marihuana and Medicine Humana** Press Inc., Totowa, NJ. 1999. pp 91-103

HECKER, M; FOEGH, M. L.; RAMWELL, P. W. Os Eicosanóides: Prostaglandinas, Tromboxanos, Leucotrienos e Compostos Relacionados. In: Katzung, B. **Farmacologia Básica e Clínica**. Sexta edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1998. p. 223-233.

H'ETU, P.; RIENDEAU, D. Cyclo-oxygenase-2 contributes to constitutive prostanoid production in rat kidney and brain. **Biochem. J.**, London, v.391, p.561–566. 2005.

HLA, T; NEILSON, K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 89, p.7384-7388, 1992.

HLA, T.; ISHOP-BAILEY, D.; LIU, C.H.; SCHAEFERS, H.J.; TRIFAN, O. C. Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes. **Inf. J. Biochem. Cell Biol.**, Exeter v.31, p.551-557, 1999.

HODGSON, H; LEVI, P. E. Metabolism of Toxicants: Phase I Reactions. In: Hodgson, E.; Levi, P.E. **Introduction to Biochemical Toxicology**. second edition, Norwalk, Connecticut. Appleton & Lange. 1994. p. 65-112.

JAGETIA, G.C.; BALIGA, M.S.; MALAGI, K.J.; KAMATH, S. M. The evaluation of the radioprotective effect of Triphala (an ayurvedic rejuvenating drug) in the mice exposed to γ -radiation. **Phytomedicine**, Copenhagen, v.9, p.99-108, 2002.

KAKIUCHI, Y.; TSUJI, S.; TSUJI, M.; MURATA, H.; KAWAI, N.; YASUMARU, M.; KIMURA, A.; KOMORI, M.; IRIE, T.; MIYOSHI, E.; SASAKI, Y.; HAYASHI, N.; KAWANO, S.; HORI, M. Cyclooxygenase-2 activity altered the cell-surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis. **Cancer Res.**, Baltimore, v.62, n.5, p.1567-1572, 2002.

KAMEI, D.; MURAKAMI, M.; NAKATANI, Y.; ISHIKAWA, Y.; ISHII, T.; KUDO, I. Potencial Role of Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 in Tumorigenesis. **J. Biol. Chem.**, v.278 p.19396-19405. 2003.

KANKAANRANTA H., RYDELL E., PETERSSON A.S., HOLM P., MOILANEN E., CORELL T., KARUP G., VUORINEN P., PEDERSEN S.B., WENNMALM A. & METSA-KETELA T. Nitric oxide-donating properties of mesoionic 3-aryl substituted oxatriazole-5-imine derivatives. **Br. J. Pharmacol.**, London, **117**: 401–406, 1996.

KAVALI, J. R.; BADAMI, B. V. 1,5-Benzodiazepine derivatives of 3-arylsydnone: synthesis and antimicrobial activity of 3-aryl-4-[2'-aryl-2',4',6',7'-tetrahydro-(1'H)-1',5'-benzodiazepine-4'-ysydnone. **Il Farmaco**, Pavia, v.55, p.406–409. 2000.

KIER, L. B.; ROCHE, E. B. Medicinal Chemistry of the Mesoionic Compounds. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v.56, n.2, p.149-168. 1967.

KIKUTA, Y.; YAMASHITA, Y.; KASHIWAGI, S.; TANI, K.; OKADA, K.; NAKATA, K. Expression and induction of CYP4F subfamily in human leukocytes and HL60 cells. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.1683, p.7-15, 2004.

KLAMT, F.; OLIVEIRA, M. R.; MOREIRA, J. C. F. Retinol induces permeability transition and cytochrome c release from rat liver mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.1726, p.14–20, 2005.

KULMACZ, R. J.; LANDS, W. E. M. Stoichiometry and Kinetics of the Interaction of Prostaglandin H Synthase with Anti-inflammatory Agents. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.260, n.23, p.12572-12578, 1985.

KUNDU, N.; FULTON, A. M. Selective Cyclooxygenase (COX)-1 or COX-2 Inhibitors Control Metastatic Disease in a Murine Model of Breast Cancer. **Cancer Res.**, Baltimore, v.62, 2343–2346, 2002.

KURUMBAIL RG, STEVENS AM, GIERSE JK, MCDONALD JJ, STEGEMAN RA, PAK JY, GILDEHAUS D, MIYASHIRO JM, PENNING TD, SEIBERT K, et al.

Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. **Nature**, London, v.384, p.644-648, 1996.

LEE, J.; KUNDU, J. K.; HWANG, D.; NA, H.; SURH, Y. Humulone inhibits phorbol ester-induced COX-2 expression in mouse skin by blocking activation of NF- κ B and AP-1: I κ B kinase and c-jun-N-terminal kinase as respective potential upstream targets. **Carcinogenesis**, Oxford, v.28, n.7, p.14891-1498, 2007.

LESLIE, C. Properties and regulation of cytosolic phospholipase. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.272, n.27, p.16709-16712, 1997.

LI, D., MOOETHY, B.; CHEN, S.; RANDEPATH, K. Effects of cytochrome P450 inducers on I-compounds in rat liver and kidney DNA. **Carcinogenesis**, Oxford, v.13, n.7, p.1191-1198, 1992.

LIMA, E. O.; MAIA, R. F.; BARBOSA FILHO, J. M.; XAVIER FILHO, L. Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Derivados Mesoioônicos. **Rev. Microbiol.** São Paulo, v.17, n.2, p.132-136. 1986.

LITCHFIELD, J.T. & WILCOXON, F. Simplified method of evaluating dose-effect experiments. **American Cyanamid Company**, Stanford Research Laboratory, Connecticut, 1948.

LOWRY O. H.; ROSEBROUGH N. J.; FARR A. C.; RANDALL R.J. Protein measurement with the polyphenol reagent, **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.193, p.265-275, 1951.

LUONG C, MILLER A, BARNETT J, CHOW J, RAMESHA C, BROWNER M. F. Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. **Nat Struct Biol.**, New York, v.3, p.927-933, 1996.

MA, X.; KUNDU, N.; RIFAT, S.; WALSER, T.; FULTON, A. M.. Prostaglandin E Receptor EP4 Antagonism Inhibits Breast Cancer Metastasis. **Cancer Res.**, Baltimore, v.66, n.6, p.2923-2927, 2006.

MAYER, L. D.; BALLY, M. B.; LOUGHREY, H.; MASIN, D.; CULLIS, P. R. Liposomal Vincristine Preparations Which Exhibit Decreased Drug Toxicity and Increased Activity against Murine L1210 and P388 Tumors. **Cancer Res.**, Baltimore, v.50, p.575-579, 1990.

MAJID, P. A.; DeFEYTER, J. F.; VAN DER WALL, E.E.; ROOS, J. P. Molsidomine in the treatment of patients with angina pectoris. **J. Med.**, Basel, v.302, n.1, p.1-6, 1980.

MANCINI, J. A.; BLOOD, K.; GUAY, J.; GORDON, R.; CLAVEAU, D.; CHAN, C.; RIENDEAU, D. Cloning, expression, and, up-regulation of Inducible Rat Prostaglandin E Synthase During Lipopolysaccharide-induced Pyresis and Adjuvant-induced Arthritis. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.276, n.6, p.4469-4475. 2001

MARRE F, SANDERINK G, SOUSA G, GAILLARD C, MARTINET M, RAHMANI R. Hepatic Biotransformation of Docetaxel (taxotereâ®) in vitro: involvement of the cyp3a subfamily in humans. **Cancer Res.**, Baltimore, v.56, p.1296-1312, 1996.

MARTIGNONI, M.; GROOTHUIS, G.; KANTER, R. Comparison Of Mouse And Rat Cytochrome P450-Mediated Metabolism In Liver And Intestine. **Drug Metab. Dispos.**, Baltimore, v.34, p.1047–1054, 2006.

MEIER, H.; GEROLDA, J.; JACOB, D. The effect of 2,2-dicyanovinyl groups as electron acceptors in push–pull substituted oligo(1,4-phenylenevinylene)s. **Tetrahedron Lett.**, Oxford, 44:1915–1918, 2003.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. Editora Pedagógica e Universitária Ltda. São Paulo. 277p. 1980.

MINAMIYAMA, Y.; TAKEMURA, S.; TOYOKUNI, S.; IMAOKA, S.; FUNAE, Y.; HIROHASHI, K.; YOSHIKAWA, T.; OKADA, S. CYP3A induction aggravates endotoxemic liver injury via reactive oxygen species in male rats. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v.37, n.5, p.703-712, 2004.

MONTANARI, C. A.; BEEZER, A. E.; SANDALL, J. P. B.; MONTANARI, M. L. C.; GIESBRECHT, A. M. On the Interaction of Some Mesoionic Compounds with *Saccharomyces cerevisiae* by Biological Microcalorimetry. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.23, n.4, p.274-278, 1992.

MONTANARI, C. A.; GIESBRECHT, A. M.; SANDALL, J. P. B.; MIYATA, Y.; MILLER, J. Mesoionic 1,3,4-oxadiazolium-2-aminide and 1,3,4 oxadiazolium-2-olate: synthesis, geometry, electronic structure and antibiotic activity. **Heterocycl. Commun.**, London, v.2., n.1, 1996.

MONTANARI, C. A.; AMARAL, A. T.; GIESBRECHT, A. M. Synthesis and antibacterial activity of some new 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide derivatives. **Pharmaceutical Sciences**, v.3, p.565-568, 1997.

MULLICAN, M. D.; WILSON, M. W.; CONNER, D.T.; KOSTLAN, C.R.; SCHRIER, D.J.; DYER, R.D. Design of 5-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,3,4-thiadiazoles, -1,3,4-oxadiazoles, and -1,2,4-triazoles as orally active, nonulcerogenic antiinflammatory agents. **J. Med. Chem.**, Washington, v.36, n.8, p.1090-1099, 1993.

MURAKAMI, M.; NARABA, H.; TANIOKA, T.; SEMMYO, N.; NAKATANI, Y.; KOJIMA, F.; IKEDA, T.; FUEKI, M.; UENO, A.; OH-ISHI, S.; KUDO, I. Regulation of Prostaglandin E₂ Biosynthesis by Inducible Membrane-associated Prostaglandin E₂ Synthase that Acts in Concert with Cyclooxygenase-2. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.275, n.42, 032783-32792, 2000.

MURAKAMI, M.; NAKATANI, Y.; TANIOKA, T.; KUDO, I. Prostaglandin E Synthase. **Prost. Lip. Med.**, V.68-69, p383-399, 2002.

NARUMIYA, S.; SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F. Prostanoid Receptors: Structures, Properties, and Functions. **Physiol Rev.**, Baltimore, v.9, p.1193-1226, 1999.

NATSUHARA, K.; SHIMADA, K.; TANAKA, T.; MIYATA, T. Phenobarbital induction of permethrin detoxification and Phenobarbital metabolism in susceptible and resistant strains of the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner). **Pest Biochem Physiol.**, San Diego, v.79, p.33-41, 2004.

NELSON, D. Disponível em: <http://drnelson.utmem.edu/p450stats.Feb2008.htm>. Acesso em 26 de novembro de 2008 12:56 h.

NELSON, D. Disponível em: <http://drnelson.utmem.edu/cytochromeP450.html> Acesso em 26 de novembro de 2008 13:00 h.

NELSON, D. R. Cytochrome P450 and the Individuality of Species. **Arch Biochem Biophys.**, New York, v.369, No.1, p.1–10, 1999.

NETTELBECK, D.M.; RIVERA, A.A.; DAVYDOVA, J.; DIECKMANN, D.; YAMAMOTO, M.; CURIEL, D.T. Cyclooxygenase-2 promoter for tumour-specific targeting of adenoviral vectors to melanoma. **Melanoma Res.**, London, v.13, p.287-292, 2003.

NEVE, E. P. A.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Molecular Basis for the Transport of Cytochrome P450 2E1 to the Plasma Membrane. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.275, n.22, p.17130–17135, 2000.

NEVE, E. P. A.; INGELMAN-SUNDBERG, M. A soluble NH₂-terminally truncated catalytically active form of rat cytochrome P450 2E1 targeted to liver mitochondria. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.460, p.309–314, 1999.

NEVE, E. P. A.; ELIASSON, E.; PRONZATO, M. A.; ALBANO, E.; MARINARI, U.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Enzyme-Specific Transport of Rat Liver Cytochrome P450 to the Golgi Apparatus. **Arch Biochem Biophys.**, New York, v.333, n.2, p.459–465, 1996.

NEWTON, C.G.; RAMSDEN, C.A. Meso-ionic heterocycles. **Tetrahedron**, Oxford, v.38, p.2965-3011, 1982.

NIWA, T.; SHIRAGA, T.; HASHIMOTO, T.; KAGAYAMA, A. Effect of Cefixime and Cefdinir, Oral Cephalosporins, on Cytochrome P450 Activities in Human Hepatic Microsomes. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, V.27, p.97-99, 2004.

NYBERG, W. H.; CHENG, C. C. 3-Piperonylsydnone. A new type of antimalarial agent. **J. Med. Chem.**, Washington, v.8, p.531-533, 1965.

OLLIS, W.D.; RAMSDEN, C.A. Meso-ionic compounds. **Adv Heterocycl Chem**, New York, v.19, p.1-121, 1976.

OMURA, T. Forty Years of Cytochrome P450. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v.266, p.690-698. 1999.

OMURA, T.; SATO, R. The Varbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. **J. Biol. Chem.**, v.239, n.7, p2379-2385, 1964.

ORELLANA, M. B.; GUARJARDO, V. T. Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. **Rev. Med. Chile**, Santiago, v.132, p.85-94, 2004.

PALASKA, E.; S_UAHIN, G. L.; KELICEN, P.; DURLU, N.T.; ALTINOK, C. Synthesis and anti-inflammatory activity of 1-acylthiosemicarbazides, 1,3,4-oxadiazoles, 1,3,4-thiadiazoles and 1,2,4-triazole-3-thiones. **Il Farmaco.**, Pavia, v.57, p.101–107, 2002.

PATEL DK, SHOCKCOR JP, CHANG SY, SIGEL CW, HUBEA BE. Metabolism of a Novel Antitumor Agent, Crisnatol, by a Human Hepatoma Cell Line, hep g2, and Hepatic Microsomes Characterization of Metabolites. **Biochem Pharmacol.**, New York, v.42, n.2, p.337-346. 1991.

PENZO, D.; PETRONILLI, V.; ANGELIN, A.; CUSAN, C.; COLONNA, R.; SCORRANO, L.; PAGANO, F.; PRATO, M.; DI LISA, F.; BERNARDI, P. Arachidonic Acid Released by Phospholipase A₂ Activation Triggers Ca²⁺-dependent Apoptosis through the Mitochondrial Pathway. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.279, n.24, p.25219-25225, 2004.

PETIT, P. X.; SUSIN, S. A.; ZAMZAMI, N.; MIGNOTTE, B.; KROEMER, G. Mitochondria and programmed cell death" back to the future **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.396, p.7-13,1996.

PHILLIPS, H.J. Dye exclusions tests for cell viability. In: Kruse, J. R.; Patterson, J. R. M. K., **Tissue culture, methods and applications**, New York, 1973, p 406-408.

RAMESHA, C.S. Human and rat cyclooxygenases are pharmacologically distinct, In: Honn, K.V.; Marnett, L.J.; Nigam, S.; Jones, R.L.; Wong P.Y.K. **Eicosanoids and Other Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Radiation Injury**, Plenum Press, 1995, pp 66-71.

RAZ, A. Is inhibition of cyclooxygenase required for the anti-tumorigenic effects of nonsteroidal, anti-inflammatory drugs (NSAIDs)? In vitro versus in vivo results and the relevance for the prevention and treatment of cancer. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v. 63. p. 343-347. 2002.

REHSE, K.; MARTENS, A. Platelet Aggregation Inhibiting and Anticoagulant Effects of Oligoamines, XX¹ 4,4',4''-(1,3,5)-Benzene-tris-sydnone Imines. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v.326, p.217-219. 1993a.

REHSE, K.; KAMPFE, M.; MARTENS, A. Platelet Aggregation Inhibiting and Anticoagulant Effects of Oligoamines, XIX: 4,4'- Phenylene-bis-sydnone Imines. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v.326, p.163-166. 1993b.

REHSE, K.; MARTENS, A. Platelet Aggregation Inhibiting and Anticoagulant Effects of Oligoamines, XXI¹⁾: 4,4'- Alkylene-bis-sydnone Imines. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v.326, p.307-311. 1993c.

Riendeau, D.; Percival, M. D.; Boyce, S.; Brideau, C.; Charleson, S.; Cromlish, W.; Ethier, D.; Evans, J.; Falgoutyret, J.-P.; Ford-Hutchinson, A.W.; Gordon, R.; Greig, G.; Gresser, M.; Guay, J.; Kargman, S.; Léger, S.; Mancini, J.A.; O'Neill, G.; Ouellet, M.; Rodger, I.W.; Thérien, M.; Wang, Z.; Webb, J.K.; Wong, E.; Xu, L.; Young, R.N.; Zamboni, R.; Prasit, P.; Chan, C.-C. Biochemical and pharmacological profile of a tetrasubstituted furanone as a highly selective COX-2 inhibitor. **Br. J. Pharmacol.**, London, v.121, p.105 – 117. 1997.

RENDIC, S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data', **Drug Metab Rev**, New York, v.34, p.183 — 448, 2002.

RIGEL, D.S.; CARUCCI, J. A. Malignant Melanoma: Prevention, Early Detection, and Treatment in the 21st Century. **Cancer J. Clin.**, v.50, p215-236, 2000.

RONIS, M. J. J.; JOHANSSON, I.; HULTENBY, K.; LAGERCRANTZ, J.; GLAUMANN, H.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Acetone-regulated synthesis and degradation of cytochrome *P4502E2* and cytochrome *P4502B1* in rat liver. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v.198, p.383-389, 1991.

ROSSI, A. D.; ROSSI, L.; LAUDISI, A. ; SINI, V. ; TOPPO, L. ; MARCHESI, F. ; TORTORELLI, G. ; LETI, M. ; TURRIZIANI, M. ; AQUINO, A. ; BONMSSAR, E. ; VECCHIS, L. D. ; TORINO, F. Focus on Fotemustine. **J. Exp. Clin. Cancer Res.** v.25, n.4, p. 461-468, 2006.

ROTZINGER, S.; BAKER, G. B. Human CYP3A4 and the metabolism of nefazodone and hydroxynefazodone by human liver microsomes and heterologously expressed enzymes. **Eur Neuropsychopharmacol.**, Amsterdam, v.12, p.91–100, 2002.

RUDOLPH, W.; DIRSCHINGER, J. Clinical comparison of nitrates and sydnonimines. **Eur. Heart J.**, London, v.12, p.33-41, 1991.

SAARIKOSKI, S. T.; WIKMAN, H. A..L.; SMITH, G.; WOLFF, C. H. J.; HUSGAFVEL-PURSIANEN. K. Localization of Cytochrome P450 CYP2S1 Expression in Human Tissues by In Situ Hybridization and Immunohistochemistry. **J. Histochem. Cytochem.**, Baltimore, v.53, n.5, p.549–556, 2005.

SAGUEM, S.; MISPELTER, J.; PERIN-ROUSSEL, O.; LHOSTE, J.M.; ZAJDELA, F. Multi-step metabolism of the carcinogen dibenzo[a,e]fluoranthene. I. Identification of the metabolites from rat microsomes. **Carcinogenesis**, New York, v.4, n.7, p.827-835, 1983.

SAKAI, A. Diclofenac inhibits endothelial cell adhesion molecule expression induced with lipopolysaccharide. **Life Sci.**, Elmsford, v.58, n.26, p.2377-2387, 1996.

SCHENONE, S.; BRULLO, C.; BRUNO, O.; BONDAVALLI, F.; RANISE, A.; Filippelli, W.; Rinaldi, B.; Capuano, A.; Falcone, G. New 1,3,4-thiadiazole derivatives endowed with analgesic and anti-inflammatory activities. **Bioorg Med Chem.**, Oxford, v.14, p.1698–1705, 2006.

SHARMA, R.; SAINY, J.; CHATURVEDI, S.C. 2-Amino-5-sulfanyl-1,3,4-thiadiazoles: A new series of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. **Acta Pharm.**, v.58, p.317–326, 2008.

SELISKAR, M.; ROZMAN, D. Mammalian cytochromes P450—Importance of tissue specificity. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.1770, p.458–466, 2007.

SEN, D. K.; MBAGWU, G.O.; ADSON, A. Effects f Mesoionic Xantine Analogs on Tripanosoma muscli Development in Mice. **J. Euk. Microbiol.**, v.40, n.3, p.259-262, 1993.

SENFF-RIBEIRO, A.; ECHEVARIA, A.; SILVA, E. F.; VEIGA, S. S.; OLIVEIRA, M. B. M. Effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on B16-F10 murine melanoma. **Melanoma Res**, London, v.13, p.1-7, 2003.

SENFF-RIBEIRO, A.; ECHEVARIA, A.; SILVA, E. F.; VEIGA, S. S.; OLIVEIRA, M. B. M. Antimelanoma activity of 1,3,4-thiadiazolium mesoionics: a structure-activity relationship study. **Anticancer Drugs**, London, v.15, p.269-275, 2004a.

SENFF-RIBEIRO, A.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E.F.; FRANCO, C.R.C.; VEIGA, S. S.; OLIVEIRA, M.B.M. Cytotoxic effect of a new 1,3,4 thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on cell lines of human melanoma. **Brit J Cancer**, Edinburgh, v.91, p.297-304, 2004b.

SENFF-RIBEIRO, A. Estudo da Atividade Antimelanoma de Compostos 1,3,4-Tiadiazóis Mesoionicos. Curitiba, 2004c. Dissertação (Doutor em Ciências – Bioqímica) – Universidade Federal do Paraná.

SENO, H.; OSHIMA, M.; ISHIKAWA, T.; OSHIMA, H.; TAKAKU, K.; CHIBA, T.; NARUMIYA, S.; TAKETO, M. M. Cyclooxygenase 2- and Prostaglandin E2 Receptor EP2-dependent Angiogenesis in *Apc_716* Mouse Intestinal Polyps1. **Cancer Res.**, Baltimore, v.62, p.506–511, 2002.

SHIMADA, T.; SUGIE, A.; SHINDO, M.; NAKAJIMA, T.; AZUMA, E.; HASHIMOTO, M.; INOUE, K. Tissui-especific induction of cytochromes P450 1A1 and 1B1 by

polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in engineered C57BL/J6 mice of arylhydrocarbon receptor gene. **Toxicol Appl Pharmacol.**, New York, V.187, p.1-10, 2003.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Principles of Instrumental Analysis**. 5ed. Orlando: Saunders College Publishing; 1998. 849p.

SONG, Y.; CONNOR, D. T.; SERCEL, A. D.; SORENSON, R. J.; DOUBLEDAY, R.; UNANGST, P.C.; ROTH, B.D.; BEYLIN, V.G.; GILBERTSEN, R.B.; CHAN, K.; SCHRIER, D. J.; GUGLIETTA, A.; BORNEMEIER, D. A.; DYER, R. D. Synthesis, Structure–Activity Relationships, and *in Vivo* Evaluations of Substituted Di-*tert*-butylphenols as a Novel Class of Potent, Selective, and Orally Active Cyclooxygenase-2 Inhibitors. 2. 1,3,4- and 1,2,4-Thiadiazole Series1. **J. Med. Chem.**, Washington, v.42, n.7, p.1161-1169, 1999.

SPARREBOOM, A.; KARLSSON, M. O. Introduction: Role of modeling and simulation in clinical development of anticancer agents. **Invest. New Drugs.**, Boston, v.21, p.139-140. 2003.

STICHTENOTH, O. D.; THORÉN, S.; BIAN, H.; PETERS-GLODEN, M.; JAKOBSSON, P.; CROFFORD, L. J. Microsomal Prostaglandin E Synthase is Regulated by Proinflammatory Cytokines and Glucocorticoids in Primary Rheumatoid Synovial Cells. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 167, p.469-474. 2001.

TANG, X.; SUN, Y.J.; HALF, M.; KUO, T.; SINICROPE, F. Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits death receptor 5 expression and confers resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human colon cancer cells. **Cancer Res.**, Baltimore, v.62, p.4903-4908, 2002.

TATSUGUCHI, A.; MATSUI, K.; SHINJI, Y.; GUDIS, K.; TSUKUI, T.; KISHIDA, T.; FUKUDA, Y.; SUGISAKI, I.; TOKUNAGA, A.; TAJIRI, T.; SAKAMOTO, C.; Cyclooxygenase-2 Expression Correlates With Angiogenesis and Apoptosis in Gastric Cancer Tissue. **Hum Pathol.**, Philadelphia, v.35, p.488-495, 2004.

TUCKER, M. A.; GOLDSTEIN, A. M. Melanoma etiology: where are we? **Oncogene**, London, v.22, p.3042-3052, 2003.

UMEHARA, K.; SHIMOKAWA, Y.; MIYAMOTO, G. Effect of probucol on cytochrome P450 activities in human liver microsomes. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.25, p.1112-1114, 2002.

VÁCLAVÍKOVÁ, R.; SOUCEK, P.; SVOBODOVÁ, L.; ANZENBACHER, P.; SIMEK, P.; GUENGERICH, F. P.; GUT, I. Different in vitro metabolism of paclitaxel and docetaxel in humans, rats, pigs and minipigs. **Drug Metab Dispos.**, Baltimore, v.32, p.666-674, 2004.

XU, X.; SANORES-GARCIA, L.; CHEN, X. ; MATIJEVIC-ALEKSIC, N. ; DU, M. ; WU, K.K. Suppression of inducible cyclooxygenase 2 gene transcription by aspirin and sodium salicylate. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.96, p.5292–5297, 1999.

WANG, R. W., NEWTIN, D. J.; SCHERI, T. D.; LU, A. Y. H. Human Cytochrome P450 3A4-catalyzed testosterone 6 β -hydroxylation and erythromycin n-demethylation. **Drug Metab. Dispos.**, Baltimore, v.25, n.4, p.502-507, 1997.

WANG, A. G.; XIA, T.; YUAN, J. ; YU, R. A.; YANG, K. D.; CHEN, X. M.; QU, W.; WAALKES, M. P. Effects of Phenobarbital on metabolism and toxicity of diclofenac sodium in rat hepatocytes in vitro. **Food and Chem. Toxicol.**, Oxford, v.42, p.1647-1653, 2004.

WILLIAMS, C. S.; TSUJII, M.; REESE, J.; DEY, S. K.; DUBOIS, R. N. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v.105, n.11, p.1589-1594, 2000.

ZBINDEN, G.; FLURY-ROVERSI, M. Significance of the LD₅₀-Test for the Toxicological Evaluation of Chemical Substances. **Arch Toxicol.**, Berlin, v.47, p.77-99, 1981.

ZHA, S.; YEGNASUBRAMANIAN, V.; NELSON, W.G.; ISAACS, W.B.; DE MARZO, A.M. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. **Cancer Lett.**, Amsterdam, v.215, p.1–20, 2004.

ANEXO

**CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**